



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

“EFECTO DE TRATAMIENTOS CON OZONO SOBRE EL
ABLANDAMIENTO Y DEGRADACION DE PARED CELULAR EN
TOMATE (*Solanum lycopersicum*)”

Trabajo final de grado

Autora: Natalia Casadei

Directora: Dra. Alicia Raquel Chaves

Co-director: Dr. Ariel Roberto Vicente

Lugar de Trabajo: CIDCA. Centro de Investigación y Desarrollo en
Criotecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP-CCT La
Plata, CONICET. Calle 47 y 116 s/n°- CP 1900 La Plata, Argentina.
Tel/Fax: (0221) 424-9287 / 425-4853. E-mail: nataliarc7@hotmail.com

Año 2008

Este Trabajo Final de Grado de la Carrera de Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), de la Facultad de Ciencias Exactas UNLP-CCT La Plata CONICET, bajo la dirección de la Dra. Alicia R. Chaves y Co-dirección del Dr. Ariel R. Vicente.

Año 2008

A mis padres, quienes me impulsaron a seguir adelante a pesar de los momentos difíciles, por enseñarme a confiar en Dios y por sus oraciones diarias a lo largo de toda mi carrera.

Al amor de mi vida, Alejo, que me enseñó a perseverar y a ponerle pasión a lo que hago y por estimularme a continuar creciendo como profesional.

AGRADECIMIENTOS

-Primero y antes que nada quisiera dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de realización de mi tesina.

-A mi Co-director Ariel Vicente cuyo invaluable y generoso apoyo e interés, hicieron posible la realización de mi tesis de grado.

-A mi Directora Alicia Chaves por su apoyo constante y su ayuda en la realización de mi tesis.

-A los chicos del grupo de vegetales, Analía Concellón, Laura Lemoine y Joaquín Hasperué por los momentos compartidos y los consejos brindados.

-A mis compañeros de carrera Emilia Lopez, Leticia Guzmán, Julia Valerga, Natalia Ranalli, Eugenia Orozco, Elina Rusconi, Marina Gorsd, Gladis Oji, Luis Rodoni, Lucas Marchetti, Facundo Massolo, Juan León, Facundo Bigne, por su compañerismo, apoyo y amistad.

-Al CIDCA por brindarme todo lo necesario para poder realizar mi tesis.

INDICE GENERAL

	Pág
<u>1. RESUMEN.</u>	1
<u>2. OBJETIVOS.</u>	3
<u>3. INTRODUCCIÓN.</u>	4
3.1. Generalidades del ozono.	4
3.1.1. Usos del ozono en tecnología de alimentos.	5
a. Procesos de desinfección de agua.	5
b. Lavado de frutas y hortalizas.	5
c. Oxidación del etileno y eliminación de microorganismos.	7
3.1.2. Efectos del ozono sobre la maduración y calidad de tomate.	7
3.2. Aspectos bioquímicos y fisiológicos asociados con el ablandamiento de frutos.	9
3.2.1. Composición y arquitectura de paredes celulares vegetales.	9
a. Celulosa.	9
b. Hemicelulosas.	9
c. Compuestos de naturaleza péctica.	10
d. Proteínas estructurales.	11
e. Compuestos aromáticos.	11
3.2.2. Interacción de componentes de pared celular.	11
3.2.3. Degradación de polisacáridos de pared celular durante la maduración.	12
a. Pérdida de galactanos y arabinanos.	13
b. Solubilización de pectinas.	13
c. Depolimerización de pectinas.	13
d. Demetilesterificación de pectinas.	14
e. Depolimerización de celulosa y hemicelulosas.	15
f. Otras modificaciones de pared celular.	15
3.2.4. Proteínas asociadas a la degradación de pared celular.	15
a. Poligalacturonasa (PG).	16
b. Pectato liasa (PL).	16
c. β -galactosidasa (β -gal).	17
d. Pectin metilesterasa (PME).	17
e. Expansinas (EXP).	17
f. Endo 1-4- β -glucanasa/glucosidasa (EGasa).	18
g. Otras enzimas.	18
3.2.5. Otras modificaciones del ambiente apoplástico.	19

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Material vegetal y tratamientos con ozono.	20
4.2. Firmeza.	20
4.3. Aislamiento de polisacáridos de pared celular y determinación de residuo insoluble en alcohol.	20
4.4. Azúcares neutros y ácidos urónicos totales de pared celular.	22
4.5. Solubilización y cuantificación de pectinas.	21
4.6. Solubilización y cuantificación de hemicelulosas.	21
4.7. Depolimerización de pectinas.	22
4.8. Actividad de enzimas que participan en la degradación de pared celular.	22
4.8.1. β -galactosidasa (β -gal).	22
4.8.2. Poligalacturonasa (PG).	22
4.8.3. Pectin metilesterasa (PME).	23
4.9. Análisis estadístico.	23

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Efecto de tratamientos con ozono sobre el ablandamiento y composición global de pared celular en tomate.	24
5.1.1. Firmeza.	24
5.1.2. Residuo insoluble en alcohol, azúcares neutros y ácidos urónicos totales.	25
5.2. Efecto de tratamientos con ozono sobre la solubilización y depolimerización de componentes de pared celular.	27
5.2.1. Solubilización de pectinas.	27
5.2.2. Depolimerización de pectinas.	29
5.2.3. Solubilización de hemicelulosas.	30
5.3. Efecto de tratamientos con ozono sobre la actividad de enzimas que degradan las pectinas de la pared celular de tomate.	32
5.3.1. Actividad β -galactosidasa (β -gal).	32
5.3.2. Actividad poligalacturonasa (PG).	33
5.3.3. Actividad pectin metilesterasa (PME).	33

6. CONCLUSIONES.

35

7. REFERENCIAS.

36

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

I. TABLAS

Pág

Tabla 1: Comparación de las propiedades del ozono y del hipoclorito de sodio como desinfectantes. 6

Tabla 2: Principales efectos de tratamientos con ozono en tomate. 8

II. FIGURAS

Pág

Figura 1: Esquema de la pared celular primaria de frutos. 12

Figura 2: Firmeza en frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha= 0,05$. El asterisco muestra diferencias significativas del respectivo control. 24

Figura 3: Contenido de pared celular total (RIA) en frutos control y tratados con ozono durante el almacenamiento a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha= 0,05$. 25

Figura 4: Azúcares neutros y ácidos urónicos en la pared celular de frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. 26

Figura 5: Esquema del fraccionamiento de pectinas a partir del RIA. 27

Figura 6: Ácidos urónicos en las fracciones solubles en agua, CDTA y carbonato de sodio en frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. 28

II. FIGURAS (Cont.)

Figura 7: Azúcares neutros en las fracciones solubles en agua, CDTA y carbonato de sodio de frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. 29

Figura 8: Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones solubles en carbonato de sodio de frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. 30

Figura 9: Esquema del fraccionamiento de hemicelulosas a partir del residuo de extracción de pectinas. 30

Figura 10: Contenido de azúcares neutros en las fracciones solubles en KOH A- 4% y B- 24%, en frutos control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha= 0,05$. 31

Figura 11: Actividad β -galactosidasa (β -gal) en frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha= 0,05$. 32

Figura 12: Actividad poligalacturonasa (PG) en frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha= 0,05$. 33

Figura 13: Actividad pectin metilesterasa (PME) en frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha= 0,05$. El asterisco muestra diferencias significativas del respectivo control. 34

1. Resumen

Se evaluó el efecto de tratamientos con ozono en fase gaseosa sobre el ablandamiento y la degradación de pared celular de tomate durante el almacenamiento poscosecha. Se trataron tomates en estado rojo claro con ozono ($10 \mu\text{L L}^{-1}$) durante 10 min y se almacenaron a 20°C por 9 d. Los frutos tratados mostraron una menor tasa de ablandamiento que los frutos control. A fin de analizar los mecanismos asociados con la menor pérdida de firmeza en los frutos tratados con ozono, se realizó una caracterización parcial de los cambios en las paredes celulares. Se efectuaron extracciones sucesivas del RIA (residuo insoluble en alcohol) con diferentes solventes. Los frutos control durante el almacenamiento, mostraron un incremento en la solubilización de pectinas en agua en detrimento de las fracciones más fuertemente asociadas a la pared (solubles en Na_2CO_3). Por su parte, en los frutos tratados con ozono este aumento no se observó. La solubilización de componentes pécticos ha sido asociada en tomate con la pérdida de galactosa de las ramificaciones laterales del ramnogalacturonano I por acción de la enzima β -galactosidasa. De todos modos, cuando se determinó la actividad de esta enzima, no se encontraron diferencias entre los frutos control y tratados. Otro cambio en los polímeros de pared que puede traducirse en un incremento en la solubilidad de las pectinas es la reducción del tamaño molecular. A fin de evaluar esta posibilidad, se analizaron las fracciones pécticas por cromatografía de exclusión molecular. Luego de 9 d de almacenamiento los frutos tratados con ozono mostraron una menor depolimerización de pectinas solubles en Na_2CO_3 que los frutos control. La depolimerización de pectinas se asocia con la acción de enzimas tales como la poligalacturonasa (PG), pero en el presente estudio no se observaron diferencias en la actividad PG entre frutos controles y tratados con ozono. De todos modos, la capacidad de depolimerización de pectinas por PG está relacionada también con la naturaleza de los sustratos disponibles. Así se conoce que la enzima pectin metilesterasa (PME) al desesterificar las pectinas genera sustratos mucho más favorables para el clivaje por acción de PG. Cuando se determinó la actividad PME se observó que luego de 9 días de almacenamiento, los frutos tratados con ozono mostraron una marcada reducción en la actividad respecto al control. Por último, no se observaron modificaciones en las hemicelulosas entre frutos control y tratados con ozono. Los resultados del presente trabajo muestran que los tratamientos con ozono en dosis apropiadas reducen el ablandamiento poscosecha de tomate. Los tratamientos provocan una disminución en la depolimerización y solubilización de pectinas. Estas modificaciones parecen estar asociadas con una reducción en la actividad PME, involucrada en la remoción de la metil esterificación de poliurónidos y que constituye un requisito para la acción de PG y/o pectato liasa (PL). Algunos trabajos han descripto que la exposición de plantas al ozono incrementa la acumulación de compuestos antimicrobianos y esto se ha asociado con la reducción en el ataque de patógenos. No obstante, más allá de la activación de mecanismos de defensa, es posible que el retraso en la degradación de pared celular contribuya a la reducción en la susceptibilidad al desarrollo de microorganismos en frutos tratados con ozono.

Palabras clave: tomate, ozono, pectinas, ablandamiento

Abstract

We evaluated the effect of ozone treatments on tomato fruit softening and cell wall degradation during postharvest storage. Fruit at the light red stage was treated with gaseous ozone ($10 \mu\text{L L}^{-1}$) for 10 min in a hermetic tray and subsequently stored at 20°C for 9 d. Ozone-treated fruit showed lower softening than control fruit. In order to analyze the mechanisms associated with the reduced loss of firmness in ozone-treated fruit, we evaluated the changes in fruit cell wall composition. We performed successive extractions of the AIR (alcohol insoluble residue) with different solvents. Control fruit showed increased solubilization of pectins in water associated with a reduced proportion of tightly bound pectins (Na_2CO_3 soluble) during storage. Ozone-treated fruit did not show this increase in water soluble pectins. Polyuronide solubilization has been associated in tomato with loss of galactose from lateral chains of the pectic polymer rhamnogalacturonan I by β -galactosidases. However, when the activity of this enzyme was measured no differences were observed between control and treated-fruit. Other change that could lead to increased solubilization of pectins is the reduction of the molecular weight of polyuronides. In order to evaluate this possibility, pectins were analyzed by size exclusion chromatography. After 9 d of storage, ozone-treated fruit showed lower depolymerization of Na_2CO_3 soluble pectins than control fruit. Pectin depolymerization is associated with the activity of some hydrolases such as polygalacturonase (PG). Interestingly, no differences in PG activity were found between control and ozone-treated fruit. Pectin depolymerizing activity by PG and pectate lyase (PL) is associated not only with the presence of these enzymes, but also with the nature of the available substrates. Indeed, it is known that the enzyme pectin methylesterase (PME) deesterifies pectins, generating substrates much more prone to be cleaved by either PG or PL. When PME activity was determined it was observed that after 9 d of storage ozone-treated fruit showed lower activity than control fruit. Finally, no differences in hemicellulose content or solubilization were observed. Results suggest that ozone treatments in appropriate doses are useful to delay tomato fruit softening. The treatments prevent pectin solubilization and depolymerization. These modifications are associated with a concomitant decrease in the activity of PME, involved in the desesterification of polyuronides, which is required for the action of other cell wall degrading enzymes such as PG. Some works have shown that ozone exposure in plants increases the accumulation of antimicrobials and this has been linked to the reduction in decay. However, it is conceivable that besides the activation of defense mechanisms, the delay in fruit cell wall degradation contributes to the reduced susceptibility to pathogen attack observed in ozone-treated fruits.

Keywords: tomato, ozone, pectin, softening

2. Objetivos

- 1- *Evaluar el efecto de los tratamientos con ozono sobre el ablandamiento y contenido de pared celular de tomate.***

- 2- *Explorar el efecto de tratamientos con ozono sobre la solubilización y depolimerización de componentes de pared celular de tomate.***

- 3- *Analizar el efecto de tratamientos con ozono sobre la actividad de enzimas asociadas a la degradación de pectinas en frutos de tomate.***

3. Introducción

3.1. GENERALIDADES DEL OZONO

El ozono (O₃) es la forma triatómica del oxígeno. Se caracteriza por su alta reactividad, actuando de forma casi instantánea (Guzel-Seydim y col., 2004). A temperatura ambiente, el ozono es un gas azulado, pero a las concentraciones a las cuales es normalmente producido, su color no es detectable (Guzel-Seydim y col., 2004). La solubilidad del ozono en agua es trece veces mayor que la del oxígeno y se incrementa a medida que la temperatura del agua disminuye (Khadre y Yousef, 2001). El ozono tiene fuertes propiedades oxidantes, es un potente agente desinfectante y precisamente estas propiedades han determinado su uso en la industria alimentaria (Kim y col., 1999). Puede, en forma directa, participar en reacciones de oxidación, afectando el desarrollo de microorganismos, aunque es relativamente inestable en soluciones acuosas. De todos modos, sus productos de descomposición, denominados especies reactivas del oxígeno también son capaces de ejercer efectos antimicrobianos (Khadre y Yousef, 2001). El ozono y sus productos primarios de descomposición actúan sobre un amplio rango de organismos, incluyendo bacterias, hongos (tanto formas vegetativa como estructuras de resistencia), protozoos y algas (Guzel-Seydim y col., 2004). Sus efectos se asocian con múltiples reacciones, incluyendo la inactivación de enzimas, la alteración de ácidos nucleicos y la oxidación de lípidos de membrana entre otros (Kim y col., 1999). La existencia de diversos sitios de acción de este compuesto determina que resulte poco probable el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos.

El ozono debe ser producido en el sitio en el que será utilizado. En general puede obtenerse a partir del oxígeno según:



La energía necesaria para efectuar la reacción anterior puede provenir de diferentes fuentes. Los generadores de ozono cuentan con dos electrodos, situados de tal manera que exista entre ellos un espacio regular en el cual se introduce un dieléctrico (Kim y col., 1999). El ozono se produce al hacer circular por este espacio intermedio aire u oxígeno puro y provocando, una diferencia de potencial elevada (Khadre y Yousef, 2001).

El uso del ozono debe realizarse en forma apropiada ya que se trata de un compuesto altamente tóxico que puede ocasionar severos daños a la salud. Los síntomas de toxicidad, tales como irritación, pueden ocurrir por exposición a concentraciones superiores a 0,1 ppm de ozono en fase gaseosa (Khadre y Yousef, 2001).

3.1.1. USOS DEL OZONO EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Existen numerosas áreas de aplicación del ozono en la industria alimentaria como la higiene de superficies, la sanitización de equipamientos, y el reciclado del agua (Rice y col., 1982). En 1997, el compuesto fue reconocido dentro de los productos GRAS (generalmente reconocido como seguro) para aplicaciones en alimentos (US FDA, 1997) lo que incrementó el interés en su utilización.

a. Procesos de desinfección de agua

Normalmente, en el proceso de potabilización, el agua es desinfectada utilizando cloro. No obstante, las propiedades del ozono como desinfectante alternativo se conocen desde hace mucho tiempo (Xu, 1999). Ya a principios del siglo XX comenzó a ser utilizado para la desinfección de aguas en Francia. El ozono es efectivo para eliminar microorganismos como *Escherichia. coli* y *Salmonella sp.* (Guzel-Seydim y col., 2004). Generalmente se utilizan 0,5 a 5 ppm de ozono con menos de 5 minutos de tiempo de contacto (Kim y col., 1999). También se ha utilizado en la desodorización (por efecto de la oxidación de cetonas, hidrocarburos, ácidos, derivados del azufre, compuestos nitrogenados, etc.) y eliminación del color de aguas, ya que reacciona con los elementos contaminantes (tales como manganeso y hierro), oxidándolos y facilitando su posterior remoción. En el caso de aguas minerales, el Código Alimentario Argentino establece que no deben poseer cloro residual, por lo que la ozonización es común como tratamiento alternativo.

b. Lavado de frutas y hortalizas

En Estados Unidos la FDA aprobó el uso de ozono, tanto disuelto en agua como en fase gaseosa, como agente antimicrobiano para el tratamiento de alimentos, incluyendo frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas. El ozono se ha aprobado específicamente dentro de los sistemas de buenas prácticas de manufactura. La capacidad de eliminación de microorganismos es variable dependiendo del producto y dosis utilizada. Achen y Yousef (2001), observaron una reducción de recuentos de *E. coli* O157:H7 en manzanas inoculadas con dicha bacteria y tratadas durante 3 minutos con ozono. En términos generales, se ha observado la reducción de la carga bacteriana en 2-3 unidades logarítmicas en los tratamientos con este gas (Williams y col., 1995). Más allá del potencial control de patógenos humanos, el ozono ha mostrado ser efectivo sobre microorganismos fitopatógenos comunes de poscosecha, aspecto que ha recibido mayor atención a la fecha con respecto a los posibles beneficios de este tipo de tratamientos (Barth y col., 1995; Sarig y col., 1996). De todos modos, en la actualidad en las líneas de lavado el hipoclorito de sodio sigue siendo el producto más comúnmente utilizado. A continuación se presentan las principales características del hipoclorito y del ozono:

Tabla 1: Comparación de las propiedades del ozono y del hipoclorito de sodio como desinfectantes.

Atributo	Hipoclorito	Ozono
Capacidad antimicrobiana	Elimina patógenos en forma efectiva. Algunos protozoos formadores de esporas son resistentes.	Elimina patógenos en forma efectiva, inclusive las formas de resistencia.
Costo	Bajo costo. En muchos casos se requieren repetir los tratamientos.	Costo inicial del generador. El costo de utilización es bajo a moderado. Para tratamientos con agua esta debe ser limpia.
Aplicación	Se aplica disuelto en el agua	Puede aplicarse en agua o bien en fase gaseosa, lo que podría resultar beneficioso en productos que no toleren el lavado o en líneas de proceso en seco.
Efecto del pH	La efectividad es menor a pH 8 o superior. Se debe ajustar a 6,0-6,5. A pH 4 o inferior puede desprenderse Cl ₂ .	La efectividad no se ve afectada marcadamente por el pH pero la descomposición del ozono se incrementa a pH superior a 8.
Subproductos del uso	Existen críticas relacionadas con la formación de compuestos orgánicos clorados.	Menor peligro, pero en el caso de aguas con bromuro pueden formarse bromatos.
Seguridad	Pueden eventualmente formarse cloraminas que son irritantes. La liberación de cloro debe controlarse a fin de evitar niveles de exposición superiores a 1 µg mL ⁻¹ .	El ozono gaseoso es irritante su concentración debe mantenerse por debajo de 0,1 ppm.
Residualidad	En agua limpia es estable, pero si el contenido de materia orgánica es elevado disminuye su concentración rápidamente.	En agua limpia persiste varios minutos pero en aguas sucias la residualidad es nula.
Dosis de uso	25-600 ppm dependiendo de la aplicación.	No limitada por regulaciones. En el caso de agua ozonizada la máxima concentración limitada por la solubilidad se ubica en 30 ppm a 20°C. En fase gaseosa se utilizan concentraciones de 0,1-10 ppm.
Uso en agua caliente	Aumenta la efectividad pero puede favorecer la liberación de vapores.	No es práctico, ya que reduce la solubilidad y acelera la descomposición del ozono.
Influencia en la calidad del producto	Bajo riesgo de efectos negativos en dosis de hasta 200 ppm.	En agua la posibilidad de daño es baja. En fase gaseosa puede en concentraciones elevadas ocasionar fitotoxicidad.
Efecto en la calidad del agua	Efectos negativos menores.	Principalmente efectos positivos favorece la eliminación de hierro y manganeso, olores y sabores objetables.
Corrosividad	Alta, especialmente sobre hierro.	Mayormente ataca al aluminio, hierro, zinc y algunos plásticos.

Tanto el ozono como el hipoclorito han mostrado ser eficaces para el control de microorganismos (Xu, 1999). Las concentraciones de aplicación son diferentes entre ambos productos; mientras que se recomiendan 200 ppm de hipoclorito, dosis de 1-2 ppm han mostrado ser eficaces en el caso del ozono. Una de las ventajas del ozono es su acción más rápida que la del hipoclorito, que determina que los tiempos de exposición puedan ser más cortos. Por otra parte, la efectividad de este compuesto muestra muy poca influencia del pH, a diferencia de lo que ocurre en el caso del hipoclorito (Tabla 1). Otra ventaja de su uso, es que no deja residuos peligrosos en las superficies de los alimentos (Pascual y col., 2007). Finalmente, el ozono presenta la posibilidad de realizar tratamientos en solución o bien en fase gaseosa, lo que podría resultar de utilidad en el caso de alimentos que no toleren el mojado. Además, esta forma de aplicación posibilita su uso para desinfección de ambientes. Algunas dificultades del uso de ozono son que, en general, se requiere personal más entrenado, así como un control de la posible

liberación de este componente a la atmósfera, ya que puede resultar tóxico en concentraciones superiores a 0,1 ppm. Finalmente, si los tratamientos no se realizan en concentraciones apropiadas pueden observarse modificaciones negativas en los alimentos. Por ejemplo, pueden acelerarse reacciones de oxidación indeseables y la aparición de síntomas de fitotoxicidad en algunos frutos (Rodoni, 2008).

c. Oxidación del etileno y eliminación de microorganismos

Además del uso de agua ozonizada en el lavado de los productos, la utilización de ozonizadores capaces de liberar el compuesto en bajas concentraciones (0,1-0,3 ppm) en las cámaras de almacenamiento ha mostrado ser efectiva en ciertos casos (Perez y col., 1999). Este tipo de estrategias puede contribuir por un lado a proteger a los productos contra el ataque de microorganismos (Liew y Prange, 1994; Palou y col., 2002). Por otra parte, el ozono parece ser efectivo en la remoción de etileno, con el consecuente beneficio para aquellos productos altamente sensibles a esta hormona (Dickson y col., 1992; Smilanick, 2003).

3.1.2. EFECTOS DEL OZONO SOBRE LA MADURACIÓN Y CALIDAD DE TOMATE

En tomate, se han evaluado diferentes tipos de aplicaciones de ozono (Tabla 2). Aguayo y col. (2006) analizaron el efecto de exposiciones cíclicas al ozono (4 ppm cada 3 h por 30 min durante 15 d) de tomate mínimamente procesado. Estos tratamientos permitieron retrasar el ablandamiento, mejorar las características organolépticas (azúcares y acidez) y reducir los recuentos de bacterias mesófilas y hongos. El segundo tipo de tratamientos que se ha estudiado incluye la exposición a atmósferas enriquecidas con ozono durante el almacenamiento, en forma continua y por largos períodos. En este caso, se observó que concentraciones de 0,005-5 ppm redujeron el desarrollo de *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum sp.*, al afectar el crecimiento de micelio y la capacidad de esporulación. Resulta interesante destacar que el efecto inhibitorio fue más marcado en ensayos *in vivo* que *in vitro*, sugiriendo que la reducción de desarrollo de hongos estaría asociada, al menos en parte, con respuestas mediadas por los frutos (Tzortzakis y col., 2007b; 2008). Esto se encuentra en línea con otros trabajos que muestran que el ozono podría activar respuestas de defensa en plantas (Langebartels y col., 2002). Por otra parte, los frutos de tomate tratados con ozono mostraron menor ablandamiento y mayor aceptabilidad en paneles de evaluación sensorial (Tzortzakis y col., 2007a).

Tabla 2: Principales efectos de tratamientos con ozono en tomate.

Tipo de trat.	Autores	Conc.	Tiempo	Observ.	Efectos principales
Exposición por periodos largos	Tzortzakis y col., 2007a	0,005-1 ppm	1-6 d	-Tratamiento en fase gaseosa. Temperatura de almacenaje 13°C	-Retraso del ablandamiento. -Menor reducción en el contenido de azúcares durante el almacenamiento. -Análisis sensorial muestra mejor apariencia y sabor.
	Tzortzakis y col., 2007b	0,005 y 5,0 ppm	0-6 d	-Tratamiento en fase gaseosa. Temperatura de almacenaje 13°C.	-Menor producción de esporas de <i>Botrytis cinerea</i> y reducción de lesiones visibles. Los resultados sugieren que existen respuestas mediadas por el fruto involucradas en la determinación del fenotipo.
	Tzortzakis y col 2008	0,05-5 ppm	0-13 d	-Tratamiento en fase gaseosa. Temperatura de almacenaje 13°C.	-Reducción de <i>Alternaria alternata</i> y <i>Colletotrichum sp.</i> -Menor esporulación y crecimiento <i>in vivo</i> . Ensayos <i>in vitro</i> sugieren que la supresión es en parte debido a cambios inducidos en los frutos.
Exposición cíclica	Aguayo y col. 2006	4 ppm	30 min	-Tratamientos repetidos cada 3 h durante todo el almacenamiento (15 d). -Tomate trozado.	-Retraso de ablandamiento Incremento de azúcares y ácidos. -Menor aroma y reducción de 1 log en bacterias mesófilas y mohos.
Tratam. cortos	Rodoni, 2008	10 ppm	10 min	Fase gaseosa. Almacenamiento de los frutos a 20°C.	-Reducción de ataque de hongos y pérdida de peso. -Incremento en la acumulación de fenoles. -Retraso de ablandamiento.
	Das y col., 2006	0-20 ppm	5-10 min	-Fase gaseosa. -Tomate cherry.	-Tratamientos con 10 mg L ⁻¹ 5-10 min fueron efectivos para controlar <i>Salmonella</i> .
	Chaidez y col., 2007	1-2 mg L ⁻¹	-Inmersión 2 min. -Spray 30 seg.	-Agua	-Inmersión redujo 2,32 y 2,53 log los recuentos de <i>Salmonella typhimurium</i> mientras que en el asperjado la reducción fue de 1,8 y 2,4 log para dosis de 1 y 2 mg L ⁻¹ respectivamente. No fue mejor que el hipoclorito.

Finalmente, algunos trabajos han evaluado la influencia de aplicaciones de ozono por períodos cortos con buenos resultados. Así, Chaidez y col. (2007) hallaron que la inmersión o el asperjado de frutos con agua ozonizada (30-120 seg; 1-2 ppm) permitieron reducir los recuentos de *Salmonella typhimurium*. Tratamientos con ozono gaseoso (10 ppm; 5-10 min) también resultaron eficaces en el control de *Salmonella* (Das y col., 2006). Por su parte, Rodoni (2008) estudió la influencia de la exposición a atmósferas enriquecidas en ozono (10 ppm; 10 min) sobre la calidad y maduración de tomate, mostrando que estos tratamientos cortos son suficientes para reducir la incidencia y enfermedades de poscosecha. En este trabajo, se observó además que los tratamientos provocaron un incremento en los niveles de fenoles totales de los frutos, lo que podría estar relacionado con la menor susceptibilidad al ataque de hongos. Por otra parte, los frutos tratados se mantuvieron, al igual que en otros estudios mencionados anteriormente, más firmes que los control. Considerando que el excesivo ablandamiento es uno de los problemas más importantes durante el almacenamiento poscosecha de frutos (Vicente y col., 2007a), aquellos tratamientos que permitan retrasar la pérdida de firmeza resultan de interés. Los resultados hallados en tomates expuestos con ozono en diferentes condiciones muestran que, más allá del

control de patógenos humanos y de poscosecha, el retraso del ablandamiento es una de las modificaciones observada en forma consistente (Aguayo y col., 2006; Tzortzakis y col., 2007a; Rodoni, 2008). De todos modos, ninguno de los estudios realizados a la actualidad ha analizado los cambios bioquímicos relacionados con el retraso del ablandamiento de frutos tratados con ozono.

3.2. ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS ASOCIADOS CON EL ABLANDAMIENTO DE FRUTOS

3.2.1. Composición y arquitectura de paredes celulares vegetales

La pared celular está compuesta por microfibrillas de celulosa, hemicelulosas, pectinas, glicoproteínas estructurales y compuestos fenólicos. Son estructuras dinámicas y altamente organizadas (Carpita y Gibeaut, 1993). Los azúcares constituyen un 90% de su peso seco. La pared celular primaria está compuesta por numerosos polímeros que varían en estructura entre las distintas especies. Los mismos se describen a continuación:

a. Celulosa

Representa aproximadamente un 30% de los polisacáridos de pared. Está compuesta por cadenas de β -(1-4)-D-glucosa con un grado de polimerización de hasta 10.000. Las cadenas de celulosa se asocian formando microfibrillas rígidas e inextensibles unidas por puentes de hidrógeno. Cada microfibrilla se forma a partir de la asociación de unas 36 cadenas de glucanos (Carpita y McCann, 2000).

b. Hemicelulosas

Constituyen en el caso de paredes celulares primarias un tercio del total de los polisacáridos parietales (Vicente, 2004). Bajo el término hemicelulosa o glucanos de entrecruzamiento se agrupan componentes que se caracterizan por su solubilidad en álcalis (Carpita y McCann, 2000). Son hetero-polisacáridos, y el más abundante es el xiloglucano (Maclachlan y Brady, 1994). Otros glucanos de entrecruzamiento que pueden hallarse en menor proporción incluyen a los glucomananos y glucuron-arabinosilanos.

b.1. Xiloglucano: Poseen una cadena principal de D-glucosa asociada por enlaces β -(1-4) al igual que la celulosa, pero en este caso presentan ramificaciones laterales de D-xilosa en forma regular en tres de cada cuatro residuos, asociados con uniones de tipo α al C 6 de la glucosa. Ocasionalmente las ramificaciones de xilosa pueden extenderse con residuos de D-galactosa, L-fucosa o L-arabinosa.

b.2. Galacto-glucomanano: Contienen una cadena principal compuesta por regiones β -(1-4)-D-glucanos y β -(1-4)-D-mananos en cantidades aproximadamente iguales con cadenas laterales ocasionales con residuos de D-galactosa.

b.3. Glucuron-arabinoxilano: Poseen una cadena principal de β -(1-4)-D-xilosa con cadenas laterales de D-arabinosa y ácido D-glucurónico. Si bien pueden encontrarse en Dicotiledóneas son comunes en Gramíneas y en paredes secundarias de especies leñosas.

c. Compuestos de naturaleza péctica

Se caracterizan por un alto contenido de residuos de ácido galacturónico, pudiendo ser lineales o ramificados (Williats y col., 2001). Asociados con este ácido pueden encontrarse residuos de ramnosa, galactosa y arabinosa. En general en las paredes celulares vegetales se distinguen 3 tipos diferenciados de compuestos pécticos: el homogalacturonano y los ramnogalacturonanos de tipo I y II (Brummell y Harpster, 2001).

c.1. Homogalacturonanos: Compuestos de largas cadenas de ácido α -(1-4)-D-galacturónico. Los mismos son sintetizados dentro de la célula y transportados por vesículas a la pared celular. Inicialmente estos presentan un alto grado de metil-esterificación en el C6 de los residuos de ácido galacturónico (GalA), pero luego conforme progresa el proceso de maduración se observa una remoción de los metil-ésteres (Carpita y McCann., 2000).

c.2. Ramnogalacturonano I (RG I): Consta de una cadena principal de residuos alternados de α -1,2-D-ramnosa α -1,4-ácido-D-GalA con largas cadenas laterales de azúcares neutros, como arabinanos, galactanos y arabino-galactanos, unidos en la posición 4 de residuos de ramnosa (Brummell, 2006).

c.3. Ramnogalacturonano II (RG II): Consiste de un núcleo central de ácido α -(1-4)-D-galacturónico como el homogalacturonano, pero con cadenas laterales complejas de distintos tipos de azúcares neutros, incluyendo apiosa que se encuentra presente sólo en este compuesto. El RG II es un componente minoritario de la pared celular, pero a pesar de esto, su capacidad de dimerizar formando puentes entre los residuos de apiosa de 2 moléculas de RG II con el anión borato, afecta marcadamente la porosidad de la pared celular (O'Neill y col., 2001; 2004).

d. Proteínas estructurales

Finalmente, una pequeña fracción de las paredes celulares se encuentra constituida por proteínas y componentes de naturaleza fenólica. Las proteínas representan 1-10% del peso seco de la pared. Existen cuatro grupos diferentes de proteínas, algunas de las cuales están altamente glicosiladas. Las mismas se clasifican según el aminoácido presente en forma más abundante o bien según el tipo de glicosilación. Los cuatro grupos se denominan proteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en glicina y arabino-galactano proteínas.

e. Compuestos aromáticos

Los componentes de naturaleza fenólica pueden participar en la formación de uniones diéster entrecruzando polímeros de la pared, unirse a residuos de arabinosa o galactosa del RG I o bien pueden reducirse ser precursores de la formación de lignina.

3.2.2. Interacción de componentes de pared celular

En la pared, las microfibrillas de celulosa están recubiertas y unidas por glucanos de entrecruzamiento, de los cuales el más abundante es el xiloglucano (Figura 1). Los xiloglucanos están ligados firmemente a la celulosa por puentes de hidrógeno, uniendo microfibrillas adyacentes (Brummell y Harpster, 2001). Los glucomananos y glucuron-arabinosilanos, están presentes en la pared en menor cantidad y se asocian con las microfibrillas de celulosa también por puentes de hidrógeno, aunque más débilmente (Brummell, 2006). El espacio entre la matriz celulosa-hemicelulosas está ocupado por pectinas altamente hidratadas, que también forman una red y se hallan unidas por enlaces tipo éster y por asociaciones de tipo iónico (Ridley y col., 2001). Las redes de pectinas pueden, además, estar unidas por enlaces covalentes a algunas moléculas de xiloglucanos e incluso a la celulosa (Thompson y Fry, 2000; Popper y Fry, 2005; Zykwincka y col., 2005). Por último, las proteínas estructurales forman una red adicional.

La estructura básica de la pared celular es probablemente como se describió anteriormente, de todos modos, su composición muestra variaciones entre especies, órganos, tejidos y aún dentro de una misma célula. En el caso particular de frutos, en general se observa un mayor contenido de pectinas (más de 40% del total) respecto a otros órganos (Carpita y McCann, 2000).

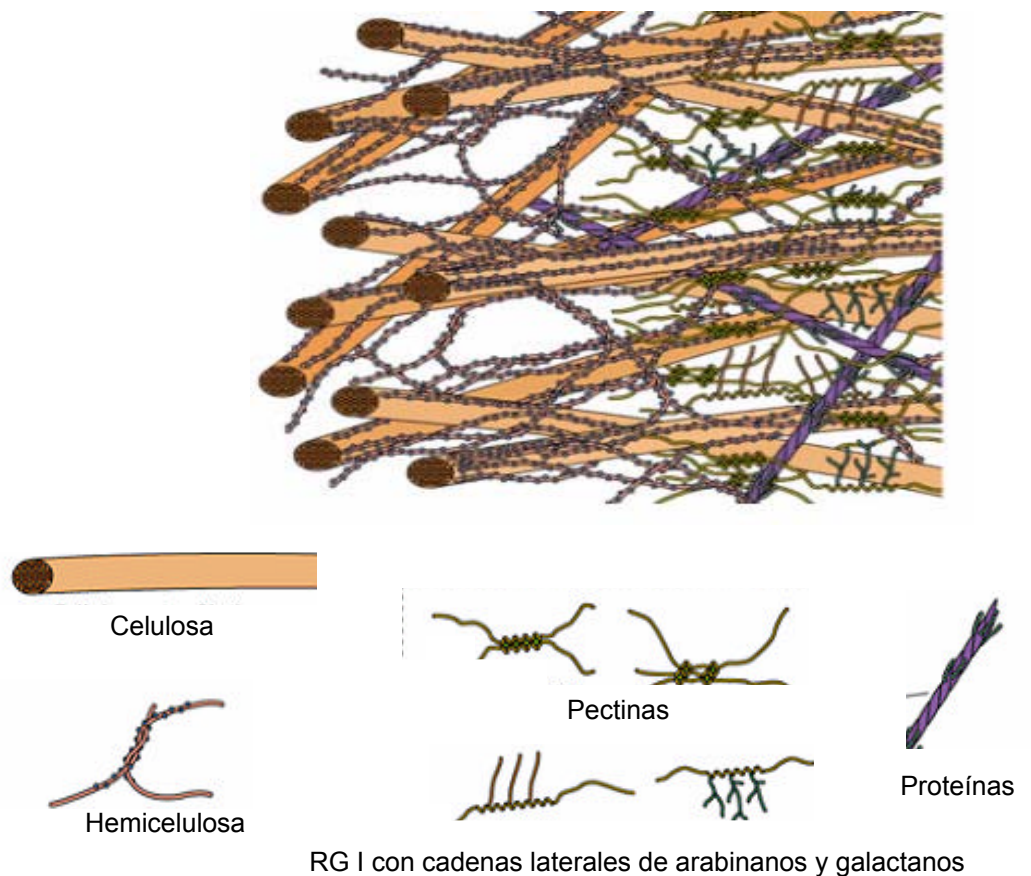


Figura 1: Esquema de la pared celular primaria de frutos (Carpita y McCann, 2000).

3.2.3. Degradación de polisacáridos de pared celular durante la maduración

La maduración está usualmente acompañada por una reducción en la turgencia de las células debido a una acumulación de solutos osmóticos en el apoplasto y a la pérdida de agua del fruto. La disminución de la turgencia reduce la presión sobre la pared y contribuye a alterar las propiedades texturales del fruto (Shackel y col., 1991). Mas allá de esto, se cree que la pérdida de firmeza de un fruto durante la maduración es en gran parte resultado del desensamblaje de la pared celular, que provee rigidez y es responsable de la adhesión intercelular (Brummell, 2006).

Durante la maduración, los polímeros presentes en ella son progresivamente modificados. Los análisis de los polisacáridos de la pared celular de frutos durante la maduración han revelado que ocurren grandes cambios tanto en las pectinas como en los glucanos (Brummell y Harpster, 2001). En términos generales, se observa que la estructura de la pared se torna cada vez más hidratada y las células pueden más fácilmente separarse (Brummell, 2006). Esta reducción de la adhesión célula-célula es causada por degradación y disolución de la laminilla media rica en pectinas (Williats y col., 2001), que constituye la zona de contacto con células vecinas. De todos modos, los procesos degradativos no se limitan a la laminilla media. Las principales modificaciones que se han descrito pueden agruparse en procesos discretos pero interrelacionados, como: a) la pérdida de galactanos y arabinanos, b) la solubilización de pectinas, c)

la depolimerización de pectinas, d) la demetil-esterificación de pectinas y e) la depolimerización de celulosa y hemicelulosas. A continuación se describe brevemente cada uno de estos procesos:

a. Pérdida de galactanos y arabinanos

La mayor parte de la galactosa y arabinosa en las paredes primarias está presente como β -(1-4)-D-galactano, ó α -(1,5)-L-arabinano en cadenas laterales del ramnogalacturonano I (RG I) donde se considera que contribuyen a la flexibilidad de la pared. Precisamente un cambio observado en frutos, en conjunción con el proceso de maduración, es la masiva solubilización y pérdida de estos azúcares (Gross y Sams, 1984). Se ha demostrado que la remoción de las cadenas de galactosa y arabinosa se asocia con un incremento en la solubilidad de las pectinas (Redgwell y col., 1997). Por otra parte, estos cambios incrementan la porosidad de la pared, lo que podría favorecer el acceso de hidrolasas y otras proteínas de degradación de pared celular a sus sustratos *in vivo*. En frutos como pera, frutilla, arándano y frambuesa se observa una marcada pérdida de arabinosa en estados intermedios de maduración. En tomate, el principal azúcar que muestra modificaciones es la galactosa, cuyo nivel disminuye conforme progresa la maduración (Gross y Sams, 1984).

b. Solubilización de pectinas

La solubilización de compuestos de pared celular se estudia realizando extracciones con diferentes solventes. En términos generales las pectinas suelen fraccionarse en 3 grupos: 1) aquellas altamente solubles y extraíbles con agua; 2) una fracción soluble en CDTA y otros agentes capaces de complejar iones metálicos como el calcio y 3) un grupo de componentes fuertemente asociados que deben ser extraídos en condiciones mas drásticas (solubles en Na_2CO_3 o HCl). Comúnmente, durante la maduración, la cantidad de poliurónidos solubles en agua se incrementa (Rose y col., 1998; Carrington y col., 1993; Vicente y col., 2007b; Peña y Carpita, 2004). Esto ocurre a expensas de pectinas solubles en carbonato de sodio y CDTA (Brummell, 2006). Estrictamente, sólo una porción de los poliurónidos se torna soluble en agua, mientras que otra fracción permanece asociada a la pared por uniones iónicas o covalentes a otros componentes de la pared. La solubilización de pectinas puede asociarse con diferentes procesos. Como ya se mencionó anteriormente, un factor que puede incrementar la facilidad de extracción de estos componentes es la remoción de arabinanos y galactanos. Por otra parte, el clivaje de cadenas de homogalacturonanos podría también contribuir a incrementar su solubilidad (Brummell, 2006).

c. Depolimerización de pectinas

La depolimerización de poliurónidos ha sido descrita en numerosas especies (Brummell, 2006). Este es, en general, uno de los cambios más tardíos asociado con el desensamblaje de

pared y se lo ha asociado con el ablandamiento en estados avanzados de maduración (Hadfield y Bennett, 1998). De todos modos, el grado de depolimerización que sufren las pectinas depende marcadamente del fruto considerado (Brummell, 2006). Así por ejemplo, en pimiento la disminución del tamaño molecular medio de pectinas es prácticamente nula, mientras que en palta se visualiza una conversión completa de largos poliuronidos a moléculas muy pequeñas. En tomate, el proceso de depolimerización muestra niveles intermedios respecto a los dos frutos mencionados anteriormente, pero resulta aún sustancial y claramente detectable mediante cromatografía de exclusión molecular (Cantú y col., 2008). La depolimerización de pectinas es llevada adelante por diversas enzimas (Fisher y Bennett, 1991). La que más atención ha recibido es la poligalacturonasa, pero también se han encontrado productos de la acción de otras enzimas como pectato liasas (Marín-Rodríguez y col., 2002). Mientras que estas enzimas son capaces de degradar el homogalacturonano (que como se mencionó anteriormente constituye el compuesto pectico más abundante en las paredes), la depolimerización de cadenas principales de pectinas como el ramnogalacturonano I requeriría la acción de la enzima ramnogalacturonano hidrolasa (Mutter y col., 1998) que llamativamente ha recibido muy poca atención (Gross y col., 1995). Algunas características de estas enzimas se mencionan más adelante.

d. Demetilesterificación de pectinas

Los homogalacturonanos son secretados a la pared celular de las plantas con un alto grado de metil-esterificación (ME), el cual disminuye durante el desarrollo debido a la acción de la enzima pectin metilestearasa (Tieman y col., 1992; Tieman y Handa, 1994). En tomate verde maduro aproximadamente el 90% de los residuos de ácido galacturónico de las paredes celulares está metil-esterificado, pero luego de la maduración el grado de ME disminuye a 35% (Brummell, 2006). La demetilesterificación provoca diferentes efectos sobre la estructura de la pared. En primer lugar, afecta la solubilidad de las pectinas y modifica las condiciones en el apoplasto ya que genera grupos carboxilos libres (disminuyendo el pH apoplástico e incrementando las cargas negativas), lo que puede restringir el movimiento de proteínas cargadas positivamente (Ridley y col., 1991; Williats y col., 2001). Desde el punto de vista del rol sobre el ablandamiento, su efecto parece ser dual. Por un lado, y en presencia de calcio, regiones no esterificadas de moléculas de homogalacturonanos se asocian a través de uniones iónicas, lo que podría incrementar la rigidez de la pared. En contraposición, la reducción en el grado de metil-esterificación puede favorecer el progreso de la degradación de las paredes celulares conforme avanza la maduración. Esto es debido a que las pectinas demetil-esterificadas constituyen un sustrato mucho más favorable para la acción de enzimas como PG.

e. Depolimerización de celulosa y hemicelulosas

Las fracciones de glucanos de la matriz son preparadas por extracción de paredes celulares depectinadas en KOH, 4 ó 24%, para producir extractos enriquecidos en glucanos débilmente y fuertemente asociados respectivamente (Brummell y Harpster, 2001). A diferencia de lo mencionado para la depolimerización de pectinas, que muestra grandes variaciones según el fruto considerado, la disminución del tamaño molecular de hemicelulosas es un cambio que se ha observado en todos los frutos analizados hasta la fecha (Brummell, 2006). En tomate, la depolimerización ocurre solamente en glucanos unidos firmemente (principalmente xiloglucano) (Maclachlan y Brady, 1994). Estos cambios se observan en estadios tempranos e intermedios de maduración y preceden en general a la depolimerización de pectinas (Brummell, 2006).

A diferencia de los descrito para las hemicelulosas, en general la celulosa no muestra grandes modificaciones durante la maduración de frutos (Brummell, 2006). Una excepción es la palta en la que sí se observa una marcada degradación (O'Donoghue y Huber, 1992).

f. Otras modificaciones de pared celular

Además del desensamblaje de la pared celular, la síntesis e incorporación de nuevos componentes en la pared continúa durante toda la maduración (Mitcham y col., 1989). Si bien los procesos de degradación han sido principalmente el foco de los estudios de ablandamiento de frutos, no resulta posible descartar que la deposición de polímeros durante la maduración, contribuya a formar nuevas asociaciones capaces de afectar la firmeza de los tejidos.

3.2.4. Proteínas asociadas a la degradación de pared celular

El desensamblaje de la pared celular vegetal durante el desarrollo se debe a la acción de numerosas proteínas (Brummell, 2006). *Arabidopsis* contiene 379 glicosil-hidrolasas (Henrissat y col., 2001). Muchas de estas poseen funciones relacionadas con la biosíntesis o degradación de la pared celular. Más allá de las hidrolasas, el metabolismo de las paredes celulares involucra la acción combinada de otras enzimas como esterasas, liasas, óxido-reductasas y trans-glicosidasas. Mientras que algunas enzimas se encuentran presentes en forma constitutiva, otras muestran variaciones conforme avanza el proceso de maduración (Fisher y Bennett, 1991). La actividad global en casi todos los casos representa el producto de la acción combinada de diversas isoformas, posiblemente con distintos sustratos específicos (Brummell, 2006). Si bien todas las especies de frutos presentan en general el mismo tipo de actividades enzimáticas, los niveles y proporción relativa de cada una pueden ser muy diferentes.

a. Poligalacturonasa (PG)

Las poligalacturonasas catalizan la hidrólisis del ácido poligalacturónico y pueden ser del tipo, exo o endo enzimas. Las de tipo exo (EC. 3.2.1.67), hidrolizan unidades de ácido galacturónico de los poliuronidos, mientras que las del tipo endo, (EC. 3.2.1.15), clivan estos polímeros en posiciones internas. En tomate, la isoforma de PG asociada con el proceso de maduración es del tipo endo, lo que redundaría en una elevada capacidad de reducir el tamaño molecular de las pectinas (Carrington y col., 1993). El rol de esta enzima en el desensamblaje de las paredes se infiere también a partir de su presencia en fitopatógenos, que durante el proceso de colonización requieren degradar en forma exitosa la pared celular de los frutos. Así, por ejemplo el genoma de *Botrytis cinerea* presenta 6 PGs diferentes, muchas de las cuales se inducen cuando el hongo se desarrolla en presencia de los frutos y no en medios de cultivo con azúcares simples disponibles (Cantu y col., 2008b). Un incremento en la actividad de PG ha sido asociado al avance en la maduración de frutos, aunque la cantidad detectada varía ampliamente entre especies. Los frutos de tomate y durazno poseen altos niveles de actividad PG (Brummell, 2006). Por el contrario, la actividad es muy baja en frutilla, boysenberry y melón (Vicente y col., 2006, 2007c; Rose y col., 1998).

Por mucho tiempo se consideró que esta enzima era crucial en la determinación del ablandamiento de frutos. De hecho la primera planta transgénica disponible a nivel comercial consistió en tomates antisentido para PG que se denominaron FlavrSavr®. La supresión de PG disminuyó la depolimerización de los poliuronidos y los frutos mostraron menor ablandamiento que los control, pero sólo en estados avanzados de maduración (Hadfield y Bennett, 1998).

b. Pectato liasa (PL)

Es conocida también como pectato trans-eliminasa (EC. 4.2.2.2), y cataliza al igual que PG la degradación de homogalacturonanos. No obstante, y a diferencia de esta, el clivaje no ocurre por una reacción hidrolítica sino por β -eliminación (Marín-Rodríguez y col., 2002). PL fue estudiada en detalle en bacterias fitopatógenas como *Erwinia*, donde contribuye a la maceración de los tejidos vegetales durante la patogénesis (Benítez-Burraco y col, 2003). Su rol en el proceso de infección parece ser crucial también en otros microorganismos. De hecho, la susceptibilidad de paltas al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* se reduce marcadamente mediante la disrupción del gen *PELB* que codifica para una pectato liasa (Yakoby y col., 2001). Del mismo modo, la supresión de PL reduce marcadamente la virulencia de *Nectria haematococca* en arveja (Rogers y col., 2000) y la infección de tejidos vegetativos de *Arabidopsis* por *Erisiphe cichoracearum* (Vogel y col., 2002).

La actividad y/o expresión de genes de PL ha sido detectada en diversos frutos. En tomate se han identificado oligosacáridos presentando el doble enlace característico de la acción de PL (An y col., 2005). En frutilla, la supresión de PL permitió obtener frutos más firmes que los control,

sugiriendo un rol importante de esta enzima en el ablandamiento (Jiménez Bermúdez y col., 2002; Santiago-Doménech y col.; 2008).

c. β -galactosidasa (β -gal)

Como se mencionó anteriormente, uno de los cambios más marcados que ocurre en las paredes celulares de muchos frutos durante la maduración, es la eliminación de galactosa. En tomate este cambio es muy marcado y el aumento de galactosa libre se observa en etapas intermedias de la maduración. Se considera que la enzima responsable de la degradación de los β -(1,4)-D-galactanos de la pared es la β -galactosidasa (EC. 3.2.1.23). Esta actividad ha sido hallada en distintos frutos. En tomate, una de las isoformas de esta enzima (β -gal4), parece ser importante como pre-requisito para facilitar el ablandamiento de frutos, ya que su supresión en estados tempranos de la maduración reduce la pérdida de firmeza (Smith y col., 2002).

d. Pectin metilesterasa (PME)

PME (EC. 1.1.11) se encuentra involucrada en la remoción de metil-ésteres del C6 de residuos de ácido galacturónico de ciertas pectinas. Ha sido identificada en diferentes tejidos y afecta numerosos procesos como el desarrollo del tubo polínico, la adhesión celular y la abscisión entre otros (Ridley y col., 2001). PME es activa en frutos, ya que comúnmente se observa que el grado de esterificación de las pectinas disminuye durante la maduración (Brummell y Harpster, 2001). En tomate, la actividad se detecta durante todo el desarrollo del fruto, mostrando un máximo cuando los frutos se encuentran en el estadio rojo claro para volver a disminuir posteriormente. La actividad global resulta de la acción de al menos 3 isoformas PE1, PE2 y PE3 (Phan y col., 2007).

e. Expansinas

Son proteínas capaces de incrementar la relajación de las paredes celulares (Mc Queen-Mason y col., 1992). Se cree que actúan ocasionando una disrupción de los puentes de hidrógeno entre las fibrillas de celulosa y los glucanos de entrecruzamiento, particularmente el xiloglucano (Mc Queen-Mason y col., 1992). En una gran variedad de frutos como por ejemplo en tomate, durazno y frutilla, se ha descrito el aumento de la expresión de genes de expansinas en forma simultánea con el ablandamiento. En tomate, se han detectado al menos 6 genes que codifican para expansinas (Rose y col., 2000). El transcripto del primer gen de expansina que se describió en este fruto (*LeExp1*) se acumula marcadamente durante la maduración (Rose y col., 1997), y su supresión reduce la tasa de ablandamiento (Brummell y col., 1999). Más allá de la acción que se ha propuesto en la interfase de la matriz de celulosa-hemicelulosa, estas proteínas parecen afectar indirectamente la degradación de pectinas, ya que es precisamente en esta fracción, donde se observaron los mayores cambios en los frutos suprimidos en *Exp1* (Brummell y col.,

1999). Las expansinas cooperarían con otras proteínas de degradación de pared celular para determinar el ablandamiento de frutos. De hecho, la supresión de *PG* y *Exp1* en forma simultánea resulta en un retraso más marcado del ablandamiento que la supresión de cada uno de estos genes en forma individual (Cantu y col., 2008a).

f. Endo- β -(1-4)-D-glucanasa / β -glucosidasa (EGasa)

Las enzimas causantes de la depolimerización de los glucanos de matriz de la pared celular se conocen como celulasas (EC. 3.2.1.4) y β -glucosidasas (EC. 3.2.1.21). El nombre celulasa utilizado originariamente se reemplazó por el de endoglucanasas (EGasas), ya que no se ha demostrado actividad de muchas de estas enzimas sobre la celulosa cristalina, sino sobre carboxi-metil-celulosa un derivado soluble de esta, que se utiliza comúnmente en los ensayos *in vitro*. Las EGasas hidrolizan enlaces internos de cadenas de glucanos unidos en uniones β -(1-4)-D adyacentes a residuos no sustituidos. En la pared celular, sus sustratos probablemente incluyen xiloglucanos y ciertas regiones de la celulosa no cristalina y posiblemente glucomanos. En tomate, la actividad EGasa está presente durante todo el desarrollo del fruto y 2 isoformas (Cel1 y Cel 2) han sido detectadas. Su contribución a la maduración no parece ser importante con la evidencia actual, ya que los frutos transgénicos en los que se suprimieron genes de EGasa, no han mostrado una reducción en el proceso de ablandamiento (Brummell y col., 1999).

g. Otras enzimas

g.1. α -L-arabinofuranosidasa (α -Afs): Esta enzima (EC. 3.2.1.55) libera residuos arabinofuranosil terminales a partir de los extremos no reductores de los polímeros ricos en arabinosa. Estos incluyen, en el caso de frutos, principalmente cadenas laterales de pectinas tipo RG I. En tomate se han detectado tres isoformas de α -Afs (Sozzi y col., 2002), pero su rol en el proceso de ablandamiento de frutos no se ha elucidado.

g.2. α y β -xilosidasa (*Xil*) (EC. 3.2.1.37): La enzima α -xil cataliza la hidrólisis de residuos de α -xilosa del xiloglucano. Por su parte las β -xil participan en la degradación de xilanos y otros polímeros conteniendo β -xilosa (Cleenput y col., 1997). Su contribución al proceso de ablandamiento de frutos no se conoce. En frutilla, se observó que la expresión de un gen de β -*xil* y la actividad enzimática fueron superiores en un cultivar con mayor tasa de ablandamiento (Bustamante y col., 2006).

g.3. Acetil-esterasa (*AE*): Más allá de la metil-esterificación de pectinas descrita anteriormente, algunos componentes de la pared celular pueden presentar O-acetilación. Si bien el grado de acetilación puede ser bajo (con algunas excepciones como la remolacha

azucarera), se ha demostrado que la presencia de estas modificaciones afecta las propiedades físico-químicas de los polímeros y su susceptibilidad a ser degradados. Así, por ejemplo, la enzima PL de *Erwinia sp.* sólo cliva aquellos residuos de ácido galacturónico que no se encuentren acetil-esterificados (Shvchik y col., 1997). La enzima acetil esterasa (EC. 3.1.1.6) participa en la remoción de acetil-ésteres de polímeros de pared (Vercauteren y col., 2002). Ha sido estudiada principalmente en microorganismos, pero se han identificado también en plantas (Searle–van Leeuwen y col., 1992). Su contribución al proceso de ablandamiento no se conoce.

3.2.5. Otras modificaciones del ambiente apoplástico

El análisis de fluido apoplástico de frutos de tomate, ha mostrado que existen grandes modificaciones en el pH y fuerza iónica durante la maduración (Almeida y Huber, 1999). Con respecto al pH, se observa un descenso de valores cercanos a 6,7 en frutos verde maduros a 4,4 en frutos en estadio rojo (Chun y Huber, 1998). Esto podría influenciar la actividad de las enzimas *in vivo* (Rose y col., 2003).

4. Materiales y métodos

4.1. MATERIAL VEGETAL Y TRATAMIENTOS CON OZONO

Se cosecharon tomates (*Solanum lycopersicum*) en estado de maduración rojo claro. Los frutos fuera de tipo, o con presencia de defectos, se eliminaron. Luego se colocaron en una cámara hermética, que se conectó a un equipo generador de ozono (Dobzono, modelo Ozolab 100). El nivel de ozono en el recipiente se controló con un sensor equipado con un semiconductor de óxidos de metales (DCMIV, International Xilix SA Argentina) y se mantuvo en una concentración de $10 \mu\text{L L}^{-1}$ por 10 min. Finalizado el tratamiento los frutos se almacenaron a 20°C por 9 d. Inmediatamente luego de los tratamientos o al final del período de almacenamiento se tomaron muestras para realizar las determinaciones con fruto fresco o bien se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.2. FIRMEZA

Se utilizó un equipo Texture Analyzer (TA.XT2, Stable Micro Systems Texture Technologies, Scarsdale, NY) equipado con una sonda plana de 8 mm de diámetro. Cada fruto se deformó 6 mm a una velocidad de $0,5 \text{ mm s}^{-1}$ en la zona ecuatorial y se registró la fuerza máxima durante el ensayo. Se realizaron 3 determinaciones por fruto y se analizaron por lo menos 30 frutos independientes para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresaron en N.

4.3. AISLAMIENTO DE POLISACÁRIDOS DE PARED CELULAR Y DETERMINACIÓN DE RESIDUO INSOLUBLE EN ALCOHOL

Los polisacáridos de pared celular se obtuvieron como residuo insoluble en alcohol (RIA) de acuerdo a d'Amour y col. (1993), con modificaciones menores. Aproximadamente 30 g de tejido congelado se homogeneizaron con 100 mL de etanol y se mantuvieron en ebullición por 45 min. La muestra se filtró por vacío y el residuo se lavó dos veces con etanol, dos veces con metanol:cloroformo (1:1) y 2 veces con acetona. Luego el RIA se llevó a estufa a 37°C por 2 d y se pesó. Los resultados se expresaron como g de RIA por 100 gramos de fruto fresco.

4.4. AZÚCARES NEUTROS Y ÁCIDOS URÓNICOS TOTALES DE PARED CELULAR

Cinco miligramos de RIA se solubilizaron adicionando 0,5 mL de H_2SO_4 98% p/p en un baño de agua hielo y agitando por 10 min. Esta operación se repitió tres veces. Posteriormente se agregaron 0,5 mL de agua y se agitó por 10 min. Esta operación se repitió 3 veces. Finalizado el proceso de disolución, las muestras se llevaron a un volumen final de 10 mL y se tomaron alícuotas para la determinación de ácidos urónicos que se realizó según Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973). Se tomaron 100 μL de las muestras, se llevó a 200 μL con agua destilada y se agregó 1 mL de solución de borato de sodio 75 mM en ácido sulfúrico 98% p/p. Se llevó a ebullición por 10 min y luego se agregó a cada tubo 20 μL de *m*-fenilfenol (0,15% p/v en NaOH

0,5% p/v). Se midió la absorbancia a 520 nm. La curva de calibración se realizó utilizando una solución de ácido galacturónico ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) como estándar. Para la determinación de azúcares neutros se utilizó el método descrito por Yemm y Willis (1954). Se tomaron $100 \mu\text{L}$ de las muestras, $400 \mu\text{L}$ de agua y se adicionó 1 mL del reactivo de antrona (2 mg de antrona por mL de H_2SO_4 98% p/p). Se llevó a ebullición por 10 min, se enfriaron los tubos y se midió la absorbancia a 620 nm. La curva de calibración se realizó utilizando una solución de glucosa ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) como estándar. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de ácidos urónicos o azúcares neutros en el RIA.

4.5. SOLUBILIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PECTINAS

Los poliuronidos se aislaron de acuerdo a Vicente y col., (2007b), con modificaciones menores. Alícuotas de 100 mg de RIA se suspendieron en 15 mL de agua y se agitaron a 20°C por 12 h. El homogenato se filtró y el sólido se lavó tres veces con 10 mL de agua destilada. Los filtrados se denominaron pectinas solubles en agua ($\text{FS}_{\text{H}_2\text{O}}$). El residuo luego se resuspendió en 20 mL de buffer ácido acético/acetato de sodio 0,05 M conteniendo CDTA 0,04 M, pH 4,5 y se agitó durante 12 h a 20°C . El homogenato se filtró y el residuo se lavó tres veces con 10 mL del mismo buffer. Los filtrados se denominaron pectinas solubles en CDTA (FS_{CDTA}). Finalmente el residuo obtenido se resuspendió en 100 mL de Na_2CO_3 0,05 M y se extrajo por 6 h a 4°C . El homogenato se filtró y el residuo se lavó tres veces con aproximadamente 10 mL de Na_2CO_3 0,05 M. El filtrado obtenido se denominó pectinas solubles en Na_2CO_3 ($\text{FS}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$). La concentración de azúcares neutros y ácidos urónicos de todas las fracciones se determinó por los métodos de Yemm y Willis (1954) y Blumenkrants y Asboe-Hansen (1973), respectivamente. En todos los casos las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de pectinas o azúcares neutros en las fracciones extraídas en agua, CDTA o Na_2CO_3 respecto al total.

4.6. SOLUBILIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HEMICELULOSAS

El residuo proveniente de la extracción de pectinas se agitó por 6 h con 20 mL de KOH 4 % a 4°C . El homogenato se filtró y luego se lavó tres veces con 5 ml de KOH 4 %. Los filtrados obtenidos se denominaron fracción hemicelulosas ($\text{FS}_{\text{KOH}4\%}$). Se realizó el mismo procedimiento pero utilizando KOH 24 % denominándose esta fracción, $\text{FS}_{\text{KOH}24\%}$. La cuantificación de hemicelulosas se realizó luego de la hidrólisis con H_2SO_4 a 100°C por 15 min. La determinación de azúcares liberados se realizó por el método descrito por Yemm y Willis (1954), utilizando glucosa como estándar. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como mg de glucosa por g de fruto.

4.7. DEPOLIMERIZACIÓN DE PECTINAS

En función de los resultados obtenidos, se realizó para las muestras de interés, una determinación de distribución de tamaño molecular por cromatografía de exclusión. Las mismas se realizaron según Vicente y col., (2007b). Se dializaron frente a agua las fracciones solubles en Na_2CO_3 , se congelaron y luego se liofilizaron. Se utilizó una columna de 105 centímetros de longitud y 1,8 centímetros de diámetro. La columna se rellenó con SepharoseTM Cl6B. Se utilizó como buffer de corrida acetato de amonio 200 mM; pH 5,0. Se utilizaron patrones de 0,5 mg mL⁻¹ de dextrano (PM 5.000.000) y glucosa para determinar el volumen muerto y efectivo. El volumen de la columna fue de 240 mL, el volumen muerto de 40 mL y el volumen efectivo de 200 mL. Se ajustó el caudal de la columna a 1 mL min⁻¹ y se sembraron aproximadamente 5 mL de cada fracción disuelta en el buffer de corrida. Se colectaron 80 fracciones de 2,5 mL cada una. Los tubos se colocaron en un baño de agua a 40°C para eliminar el amonio que interferiría con la determinación de ácidos urónicos. La concentración de ácidos urónicos de todas las fracciones se determinó por el método del *m*-hidroxidifenilo (Blumenkrants y Asboe-Hansen, 1973).

4.8. ACTIVIDAD DE ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACIÓN DE PARED CELULAR

4.8.1. β -galactosidasa (β -gal)

Aproximadamente 5 g de frutos congelados se procesaron en un molinillo y se extrajeron con 16 mL de buffer (ácido acético/acetato de sodio 50 mM pH 5,5; NaCl 1 M; PVPP 10 g L⁻¹). La suspensión obtenida se agitó por 2 h y luego se centrifugó a 12.000 x *g* por 10 min. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de la actividad β -gal. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado. La actividad β -gal se midió en una mezcla de reacción conteniendo, 800 μL de buffer ácido acético/acetato de sodio 0,05 M pH 5,0, 200 μL de *p*-nitrofenil β -D-galactopiranosido 3 mM y 500 μL del extracto. La mezcla de reacción se incubó a 37°C y se tomaron alícuotas de 200 μL a diferentes tiempos y se adicionaron 500 μL de Na_2CO_3 0,4 M. Se midió la absorbancia a 410 nm. La actividad β -galactosidasa se expresó como la variación en la absorbancia kg⁻¹ h⁻¹.

4.8.2. Poligalacturonasa (PG)

Aproximadamente 5 g de frutos congelados se procesaron en un molinillo con 16 mL de buffer de extracción (ácido acético/acetato de sodio 50 mM pH 5,5; NaCl 1 M; polivinilpirrolidona; PVPP 10 g L⁻¹). La suspensión obtenida se agitó por 2 h y luego se centrifugó a 12.000 x *g* por 10 min. El sobrenadante se dializó por 12 h en buffer ácido acético/acetato de sodio 50 mM pH 5,5. El extracto obtenido se utilizó para la determinación de la

actividad PG. Todos los pasos durante la preparación de los extractos se realizaron a 0-4°C. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento, y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado. La actividad se ensayó en una mezcla de reacción conteniendo ácido acético/acetato de sodio 50 mM pH 5,5; ácido poligalacturónico 0,15% p/v y 600 μ L extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó a 37°C y se tomaron alícuotas de 200 μ L a diferentes tiempos y el ácido galacturónico (AG) liberado se midió con 2-ciano-acetamida de acuerdo a Gross (1982). Las alícuotas provenientes de la mezcla de reacción se adicionaron a tubos conteniendo 1 mL de borato de sodio 0,1 M. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de 2-ciano-acetamida 1% y se mantuvieron los tubos a ebullición por 10 min. Posteriormente se determinó la absorbancia a 276 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando ácido galacturónico (AG) como estándar. Los resultados se expresaron como μ g de AG $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$.

4.8.3. Pectin metilesterasa (PME)

Aproximadamente 5 g de frutos congelados se procesaron en un molinillo con 16 mL de NaCl 1 M y PVPP 10 g L^{-1} . La suspensión obtenida se agitó por 4 h y luego se centrifugó a 12.000 x g por 30 min. El sobrenadante se ajustó a pH 7,5 con NaOH y se utilizó para ensayar la actividad PME. Se realizaron dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado. La actividad se ensayó en una mezcla de reacción conteniendo 1 mL de pectina 0,5% p/v, 400 μ L de azul de bromotimol 0,01% en buffer fosfato 0,003 M pH 7,5; 1,55 mL de agua pH 7,5 y 50 μ L de extracto enzimático. Se midió la reducción de la densidad óptica a 620 nm a 37°C. Los resultados se expresaron como el cambio en la absorbancia $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$.

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial. Los datos se analizaron por medio de ANOVA y las medias se compararon con un test de Fisher a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

5. Resultados y discusión

5.1. EFECTO DE TRATAMIENTOS CON OZONO SOBRE EL ABLANDAMIENTO Y COMPOSICIÓN GLOBAL DE PARED CELULAR EN TOMATE.

El ablandamiento excesivo es uno de los problemas más importantes en la conservación poscosecha de muchos frutos (Brummell, 2006). La pérdida excesiva de firmeza es particularmente importante en el caso de tomate, ya que se traduce en un incremento en la susceptibilidad al daño mecánico y al ataque de hongos, lo que resulta negativo durante la distribución y transporte (Cantú y col., 2008a). Este proceso se ha asociado con la degradación de paredes celulares. El primer objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los tratamientos con ozono sobre el ablandamiento y contenido total de pared celular de tomate.

5.1.1. Firmeza

La Figura 2 muestra los cambios en la firmeza de frutos control y tratados con ozono durante el almacenamiento a 20° C. En ella se ve que inmediatamente luego de la exposición al ozono, no se observaron diferencias significativas de firmeza entre los frutos control y tratados. No obstante, la velocidad de ablandamiento durante el período de almacenamiento fue menor en los frutos tratados con ozono. La pérdida de firmeza en los frutos control fue de 1,8 N día⁻¹ mientras que este valor fue de 1,3 N día⁻¹ para los frutos sometidos al tratamiento con ozono. Consecuentemente luego de 9 días de almacenamiento los frutos tratados mostraron valores de firmeza significativamente superiores a los de los frutos control.

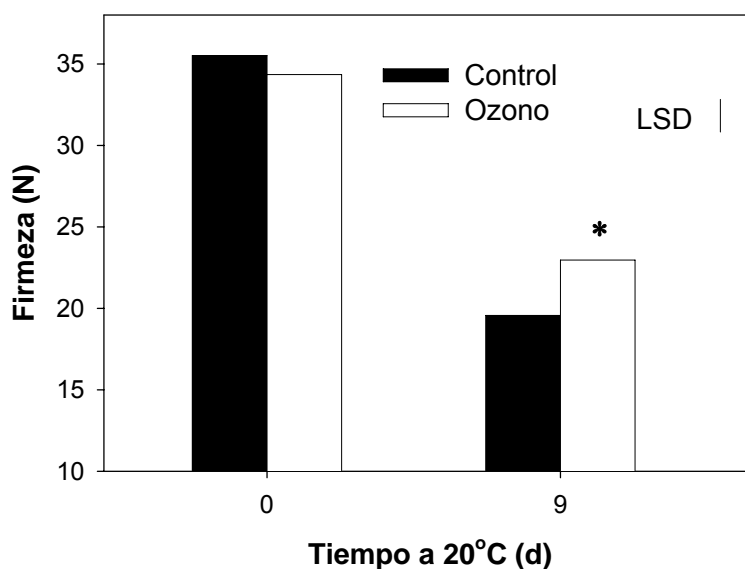


Figura 2: Firmeza en frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha= 0,05$. El asterisco muestra diferencias significativas del respectivo control.

Otros trabajos también describieron que los tratamientos con ozono permitieron mantener la firmeza de frutos de tomate (Aguayo y col., 2006; Tzortzakis y col., 2008). No obstante, la

duración de la exposición a la atmósfera enriquecida en ozono en estos casos fue mucho mayor (13-15 días) y la concentración utilizada (0,005-4 ppm) inferior a la ensayada en el presente estudio. Los resultados hallados muestran que exposiciones por períodos cortos (10 min, 10 ppm) pueden también ser beneficiosas para retrasar el ablandamiento de frutos de tomate. Los estudios realizados a la fecha no obstante se han limitado a describir el efecto sobre la firmeza sin analizar las modificaciones que podrían estar asociadas con el fenotipo observado. En ese sentido, en este trabajo se decidió avanzar en el estudio de los cambios bioquímicos relacionados con el retraso del ablandamiento en frutos expuestos a atmósferas enriquecidas en ozono.

5.1.2. Residuo insoluble en alcohol, azúcares neutros y ácidos urónicos totales

El ablandamiento de frutos durante la maduración es afectado por diversos factores. En el caso de frutos en los que la expansión y maduración se superponen como la frutilla o frambuesa, la elongación celular puede afectar las propiedades texturales (Sexton y col., 1997; Waldron y col., 2003). Cambios en la presión de turgencia de las células, el daño de membranas celulares y la deshidratación excesiva, también pueden traducirse en modificaciones en la firmeza (Shackel y col., 1991; King y col., 2000; Salentijn y col., 2003). Mas allá de la influencia de los factores previamente mencionados, se conoce que la degradación de pectinas, hemicelulosas y en ciertos casos celulosa, posee un rol central en la alteración de la estructura de la pared celular que se asocia con la pérdida de firmeza (Huber, 1984, Seymour y col., 1990). En el presente trabajo el contenido total de pared celular, determinado como residuo insoluble en alcohol (RIA), representó valores cercanos al 1,3% del peso de los frutos (Figura 3) y no mostró diferencias entre los tratamientos ni cambios en el almacenamiento. Es posible que debido a que se trabajó con frutos en estado de maduración rojo claro esta determinación no permita evidenciar modificaciones.

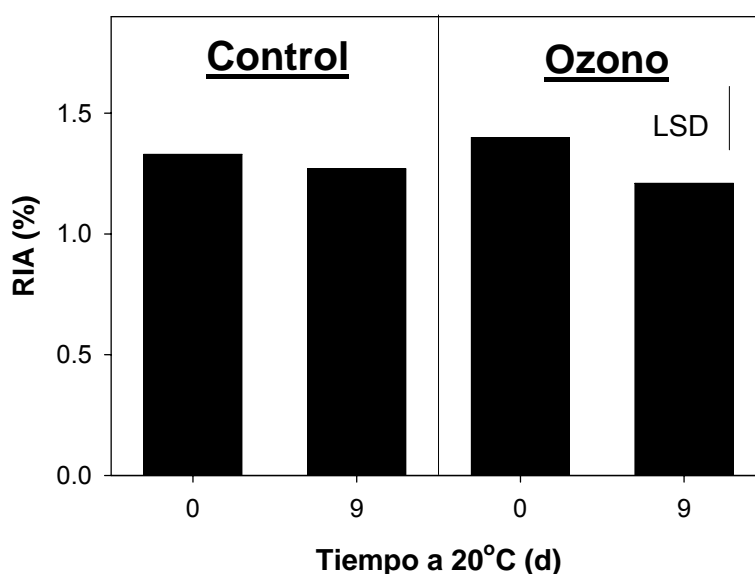


Figura 3: Contenido de pared celular total (RIA) en frutos control y tratados con ozono durante el almacenamiento a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

Como se mencionó anteriormente los polisacáridos son los componentes mayoritarios de las paredes celulares. Por lo tanto, se analizó el contenido de ácidos urónicos y azúcares neutros en el RIA. La determinación de ácidos urónicos permite estimar la proporción de pectinas en la pared celular, ya que el ácido galacturónico es el residuo más abundante en estos compuestos. Por su parte, la determinación de azúcares neutros estima los niveles de otros azúcares no ácidos. Los azúcares neutros se encuentran en las paredes celulares vegetales, principalmente asociados con la hemicelulosa y celulosa (Carpita y McCann, 2000) y ciertos polímeros pécticos (Carpita y Gibeaut, 1993). Los resultados obtenidos mostraron que las pectinas representaron aproximadamente un 40% de los azúcares presentes en el RIA, correspondiendo el 60% restante a los azúcares neutros (Figura 4). Estos niveles fueron similares para frutos control y tratados y no mostraron grandes variaciones durante el período de almacenamiento.

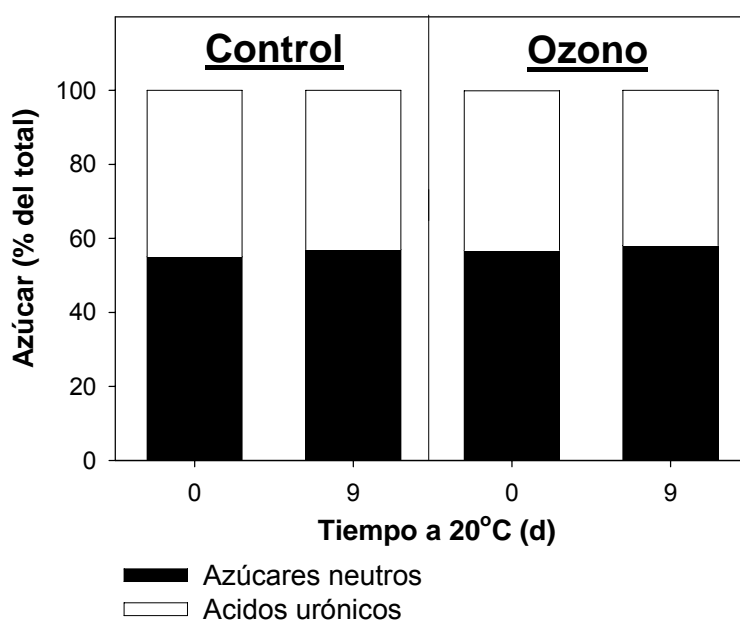


Figura 4: Azúcares neutros y ácidos urónicos en la pared celular de frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. LSD ($\alpha=0,05$) = 8,1%

5.2. EFECTO DE TRATAMIENTOS CON OZONO SOBRE LA SOLUBILIZACIÓN Y DEPOLIMERIZACIÓN DE COMPONENTES DE PARED CELULAR

En tomate se han estudiado en detalle los cambios en la pared celular asociados al ablandamiento y se conoce que el desensamblaje de los polisacáridos parietales es marcado (Brummell y Harpster, 2001). En ese sentido, se decidió avanzar con el estudio más detallado de las modificaciones de los polímeros presentes en el RIA a partir de su fraccionamiento.

5.2.1. Solubilización de pectinas

Con el objetivo de estudiar este proceso de solubilización de los componentes de la pared celular, se realizaron extracciones sucesivas del RIA con diferentes solventes. La secuencia de fraccionamiento se muestra en la Figura 5. Las primeras 3 extracciones se realizaron con agua, CDTA y Na_2CO_3 . En general, en estas fracciones, se solubilizan principalmente los componentes de naturaleza péctica. La extracción en agua permite solubilizar a las pectinas lábilmemente asociadas a la pared. Por su parte, la extracción con CDTA, solubiliza polisacáridos asociados a por puentes de calcio. Por último la extracción con Na_2CO_3 permite solubilizar componentes unidos a la pared en forma covalente.

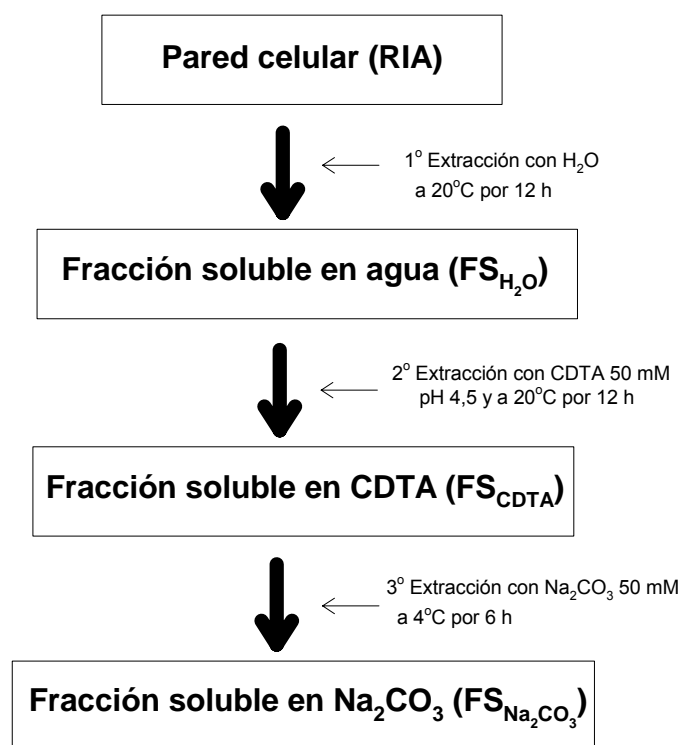


Figura 5: Esquema del fraccionamiento de pectinas a partir de los RIA.

Luego de las extracciones, se procedió a determinar en cada fracción para los frutos control y tratados con ozono el contenido de ácidos urónicos y azúcares neutros. En este caso se observó un comportamiento diferencial entre los tratamientos. Al inicio del almacenamiento la fracción de pectinas lábilmente asociadas a la pared (FS_{H_2O}) representó aproximadamente un 25-30% del total tanto en frutos control como en los tratados con ozono y, mientras que este porcentaje se incrementó a cerca del 42% del total de las pectinas en los frutos control luego de 9 d a 20°C, en los frutos tratados con ozono no se observaron variaciones respecto al valor inicial (Figura 6). El aumento en la proporción de pectinas solubles en agua en los frutos control se asoció con una reducción de las pectinas iónicamente (FS_{CDTA}) asociadas a la pared desde valores de 49% al comienzo del ensayo hasta 34% al final del período de almacenamiento. Por otro lado, las pectinas unidas covalentemente a la pared ($FS_{Na_2CO_3}$) no se vieron modificadas a lo largo del almacenamiento tanto en frutos control como tratados.

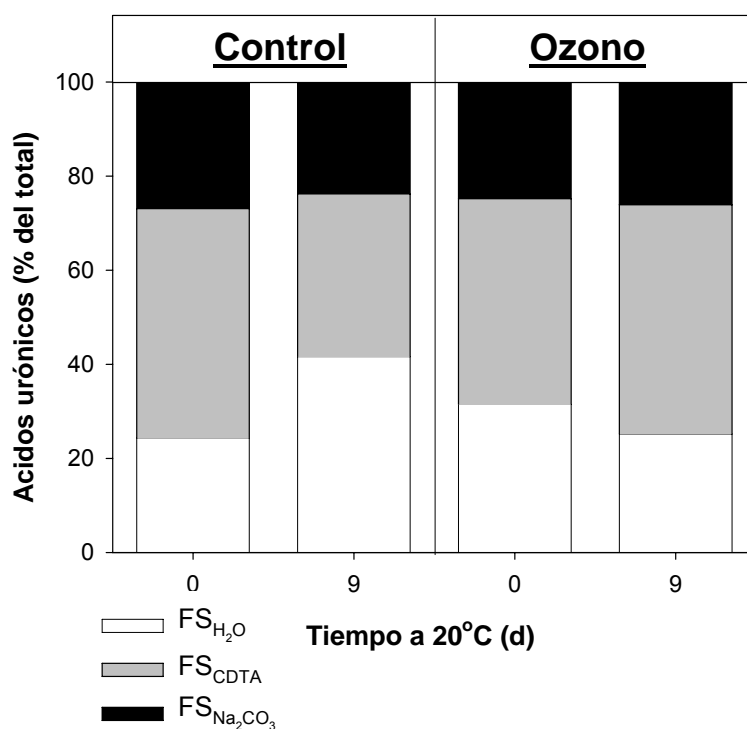


Figura 6: Ácidos urónicos en las fracciones solubles en agua, CDTA y carbonato de sodio de frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. LSD ($\alpha=0,05$) = 9,8%.

El mismo patrón con respecto al incremento en las fracciones solubles en agua de frutos control se observó cuando se realizaron las determinaciones de azúcares neutros (Figura 7), con la diferencia de que en este caso se vio reducido el contenido de azúcares neutros de la FS_{Na₂CO₃}. Los resultados muestran que la solubilización de pectinas en las distintas fracciones es retrasada como consecuencia de los tratamientos con ozono.

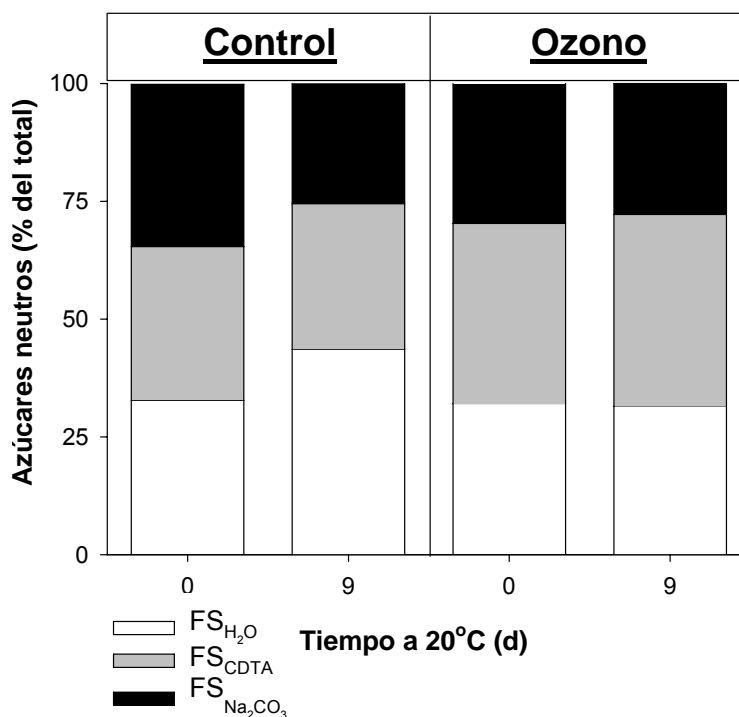


Figura 7: Azúcares neutros en las fracciones solubles en agua, CDTA y carbonato de sodio de frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. LSD ($\alpha=0,05$) = 7,1%

5.2.2. Depolimerización de pectinas

La depolimerización de pectinas podría contribuir a incrementar la solubilización y facilidad de extracción de estos componentes (Brummell y Labavitch, 1997). En ese sentido, se decidió determinar los cambios en el tamaño molecular de las pectinas por cromatografía de exclusión molecular. Los resultados de la cromatografía para las fracciones solubles en Na₂CO₃ de los frutos control y tratados con ozono se presentan en la Figura 8. Los perfiles hallados muestran que el proceso de depolimerización de pectinas fue retrasado como consecuencia de la exposición a la atmósfera enriquecida en ozono.

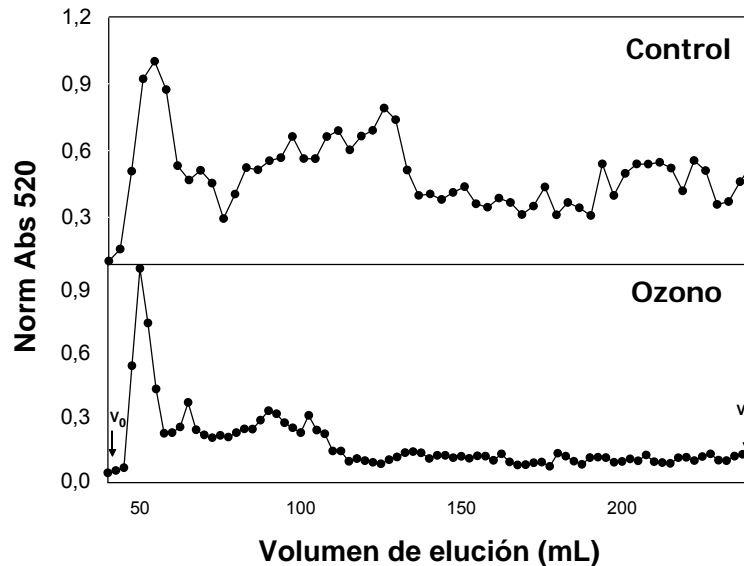


Figura 8: Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones solubles en Na_2CO_3 en frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. V_0 , volumen muerto; V_t , volumen total.

5.2.3. Solubilización de hemicelulosas

Por último, las fracciones enriquecidas en hemicelulosas se obtuvieron a partir del residuo del fraccionamiento de pectinas con KOH 4% y 24%. La primera fracción suele ser enriquecida en compuestos hemicelulósicos menos fuertemente unidos a la pared (glucomananos y mananos). Mientras que la extracción con KOH 24% suele contener principalmente xiloglucano (Figura 9).

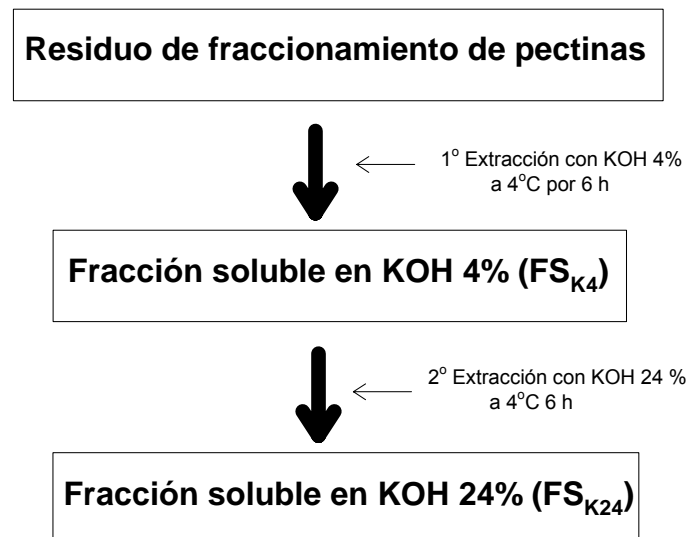


Figura 9: Esquema del fraccionamiento de hemicelulosas a partir del residuo de extracción de pectinas.

En el presente trabajo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de azúcares neutros en frutos control y tratados durante el almacenamiento en las fracciones hemicelulósicas (Figura 10). La depolimerización y solubilización de los xiloglucanos es una característica de la mayor parte de los frutos en maduración, incluyendo al tomate. De todos modos se ha observado que en general estos cambios ocurren en estadios tempranos o intermedios del proceso de maduración (Rose y col., 1998; Maclachlan y Brady, 1994).

En síntesis, se observa una menor solubilización y depolimerización de las pectinas como consecuencia del tratamiento con ozono, pero no de hemicelulosas. Algunos trabajos han descrito que la exposición de plantas al ozono incrementa la acumulación de compuestos antimicrobianos (Sandermann y col., 1998) y esto se ha asociado con la reducción en el ataque de patógenos en tejidos tratados. De todos modos se conoce que la pared celular constituye también una barrera importante contra el desarrollo de microorganismos (Cantú y col., 2008) y los resultados del presente estudio sugieren que más allá de la activación de mecanismos de defensa es posible que el retraso en la degradación de pared celular contribuya a reducir la susceptibilidad al desarrollo de microorganismos en frutos tratados con ozono.

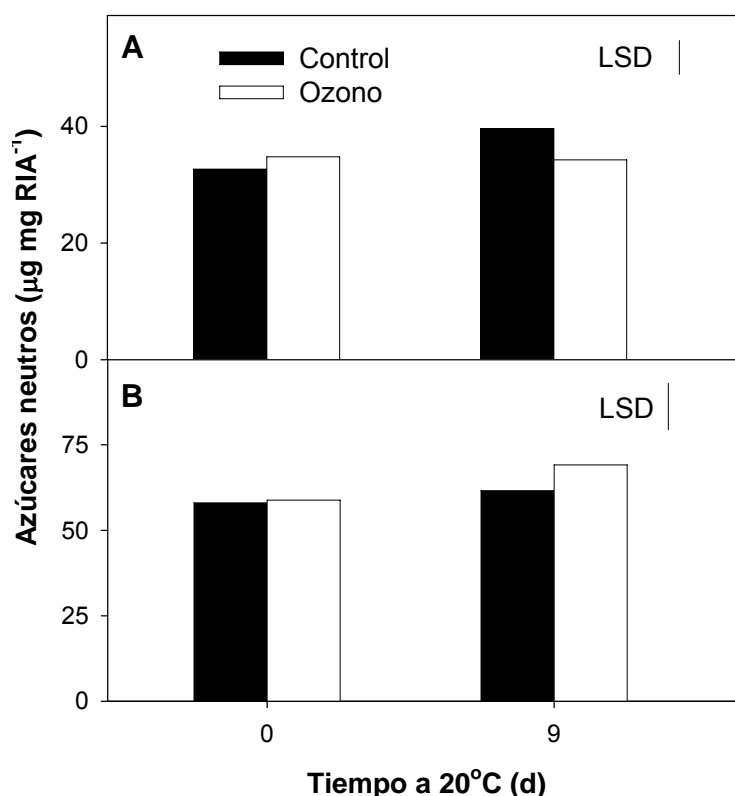


Figura 10: Contenido de azúcares neutros en las fracciones solubles en KOH A- 4% y B- 24%, en frutos control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

5.3. EFECTO DE TRATAMIENTOS CON OZONO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS QUE DEGRADAN LAS PECTINAS DE LA PARED CELULAR DE TOMATE.

La degradación de paredes celulares durante el desarrollo se debe a la acción de numerosas enzimas, por lo que se decidió estudiar los cambios en la actividad de aquellas vinculadas al metabolismo de pectinas ya que fue precisamente en esta fracción en la que se encontraron mayores cambios en la pared entre frutos control y tratados con ozono.

5.3.1. Actividad β -galactosidasa (β -gal)

Como se mencionó anteriormente la pérdida de galactosa es particularmente marcada en el caso de tomate (Gross y Sams, 1984). Más aún, se ha sugerido que estos cambios se asocian con un incremento en la solubilización de las pectinas. El clivaje de polímeros conteniendo galactosa se vincula con la actividad de la enzima β -galactosidasa (β -gal). Durante el desarrollo de tomate se expresan al menos 7 genes que codifican para β -gal (Smith y Gross, 2000). En nuestro trabajo no se hallaron diferencias en la actividad de esta enzima entre frutos control y tratados (Figura 11), sugiriendo que la menor solubilización de pectinas observada en los frutos tratados no estaría asociada con diferencias en el clivaje de galactosa. De todos modos, la confirmación de esto requeriría el análisis de los cambios en los niveles de este azúcar en las fracciones pécticas.

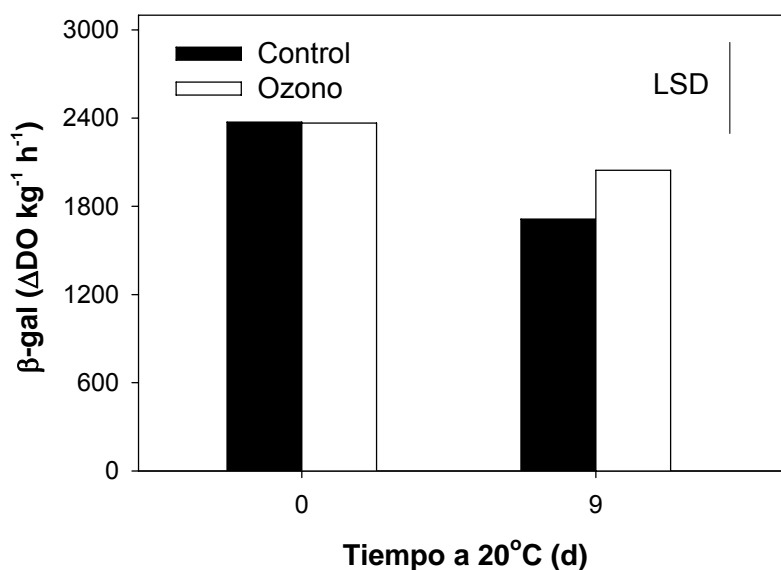


Figura 11: Actividad β -galactosidasa (β -gal) en frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

5.3.2. Actividad poligalacturonasa (PG)

En tomate se conoce que la enzima PG participa en el clivaje de poliurónidos (Carrington y col., 1993). Resulta interesante que en nuestro estudio a pesar de hallar diferencias en la depolimerización de pectinas entre frutos control y tratados (Figura 8), no se observaron diferencias significativas en la actividad PG (Figura 12). Esto sugiere que modificaciones en la degradación de polímeros parietales observada en los frutos tratados con ozono (menor solubilización y depolimerización) tampoco se deberían a cambios en la actividad PG.

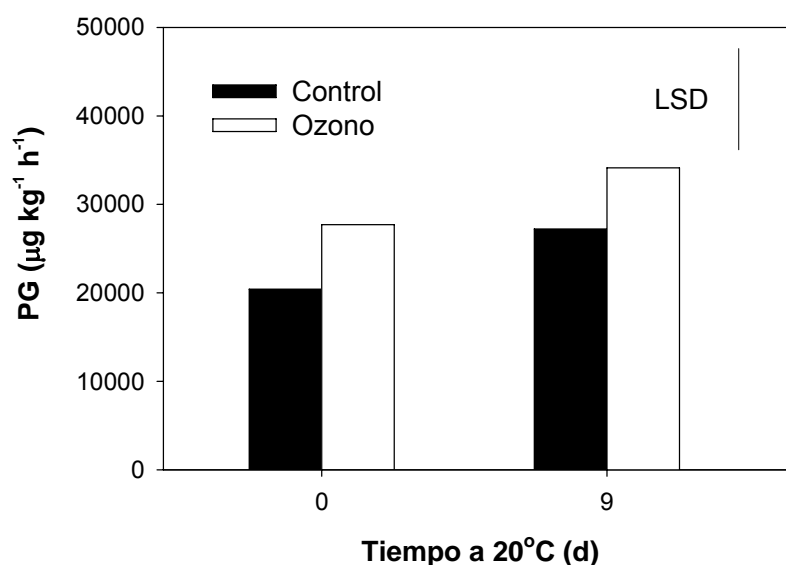


Figura 12: Actividad poligalacturonasa (PG) en frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

5.3.3. Actividad pectin metilesterasa (PME)

Los resultados mostraron que si bien inmediatamente luego del tratamiento con ozono no se encontraron diferencias, los frutos tratados luego de 9 d de almacenamiento presentaron una actividad PME 50% menor que los frutos control (Figura 13). Rico y col., (2006) también hallaron que la actividad PME fue reducida en lechuga como consecuencias de tratamientos con ozono. El sustrato de PG en la pared celular es principalmente el homogalacturonano el cual es secretado a la pared celular altamente metil-esterificado y debe ser desesterificado para ser sustrato de PG (Williats y col., 2001). En ese sentido, la reducción en la actividad PME podría estar relacionada con la menor depolimerización de pectinas que se observa en los frutos tratados con ozono y potencialmente con el menor ablandamiento. Si bien esto parecería estar en contraposición con resultados recientes en los que la supresión de PME1 aceleró el ablandamiento de frutos (Phan y col., 2007), resulta importante destacar que PME1 representa la isoforma predominante en frutos en estadios tempranos de desarrollo, siendo su contribución mínima en frutos maduros, en los que PME2 sería la forma más abundante. Trabajos previos en los que se redujo la actividad de la

enzima en estadios avanzados de maduración, mostraron, al igual que lo observado en respuesta a los tratamientos con ozono, una marcada disminución en la depolimerización de pectinas (Tieman y col., 1992; Tieman y Handa, 1994). Con respecto a la firmeza, llamativamente en los trabajos mencionados luego de 5 semanas de almacenamiento a 25 °C, los frutos suprimidos en PME mostraron una pérdida de integridad de los tejidos sugiriendo un rol de las interacciones con calcio en la manutención de la estructura de frutos sobremaduros. No obstante, en el estadio rojo maduro los frutos suprimidos en PME presentaron valores de firmeza algo superior a los frutos control. En este escenario resultaría posible especular que el retraso en la degradación de la pared celular en los frutos tratados con ozono podría asociarse con la menor actividad PME y que constituye un pre-requisito para la acción de PG.

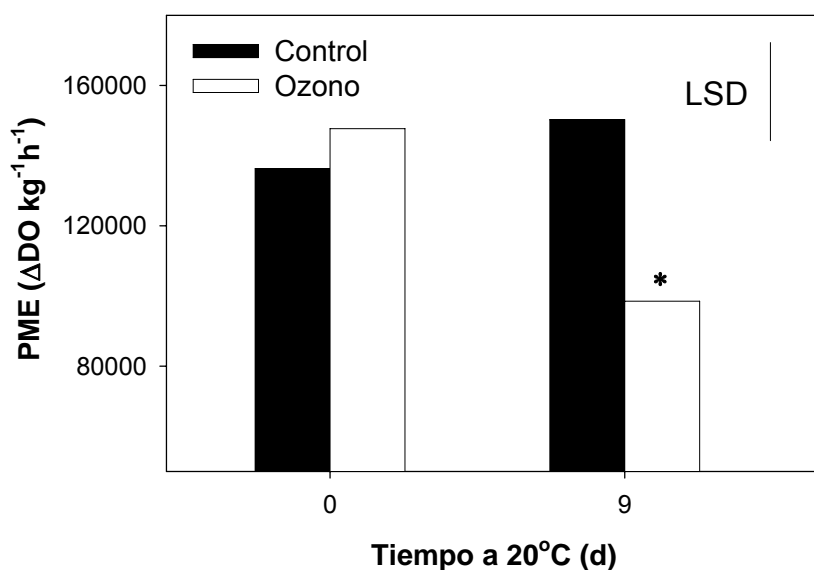


Figura 13: Actividad pectin metilesterasa (PME) en frutos de tomate control y tratados con ozono y almacenados a 20°C por 9 d. La barra representa la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de $\alpha=0,05$. El asterisco muestra diferencias significativas del respectivo control.

De todos modos resulta posible que las diferencias en el ablandamiento observadas se deban a cambios en otras enzimas como pectato liasa que se conoce es activa en tomates (An y col., 2005). No es posible descartar la existencia de modificaciones en la matriz de proteínas de pared celular en los frutos tratados, que podrían también contribuir potencialmente a retrasar el ablandamiento. En plantas se ha sugerido que el entrecruzamiento oxidativo de proteínas puede provocar su rápida insolubilización reforzando la pared (Brisson y col., 1994). Fry (1982) mostró que las proteínas parietales pueden entrecruzarse por asociación de dos residuos de tirosina (para formar di-tirosina) y trabajos previos describieron que los tratamientos con ozono pueden favorecer la formación de este tipo de enlaces (Ignatenko y Cherenkevich, 1985; Verweij y col., 1982). Inclusive, esta red de proteínas contribuiría en las respuestas iniciales de defensa al ataque de patógenos (Ribeiro y col., 2006).

6. Conclusiones

- *Los tratamientos con dosis apropiadas de ozono permiten retrasar el ablandamiento en tomate y provocan una menor solubilización y depolimerización de pectinas pero no de hemicelulosas*
- *Los tratamientos no afectan la actividad de las enzimas β -galactosidasa y poligalacturonasa pero reducen significativamente la actividad de pectin metilesterasa. La menor actividad de esta última enzima podría contribuir a retrasar la degradación de la pared celular en los frutos tratados con ozono.*
- *De todos modos no es posible eliminar otras posibilidades como la reducción en la actividad de pectato liasa o bien el entrecruzamiento de proteínas que podrían modificar la pared celular en los frutos tratados con ozono y potencialmente contribuir a la reducción del ablandamiento observado.*
- *Ciertos trabajos han mostrado que la exposición de plantas al ozono incrementa la acumulación de compuestos antimicrobianos y esto se ha asociado con la reducción en el ataque de patógenos en frutos tratados. No obstante, es posible que más allá de la activación de mecanismos de defensa el retraso en la degradación de pared celular contribuya a reducir la susceptibilidad al desarrollo de microorganismos en frutos tratados con ozono.*

7. Referencias

- Achen M, Yousef AE. 2001. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. *J. Food Sci.* 66, 1380–1384.
- Aguayo E, Escalona VH, Artés, F. 2006. Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 169–177.
- Almeida DPF, Huber DJ. 1999. Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: a potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. *Physiol Plant* 105, 506–512.
- An HJ, Lurie S, Greve LC, Rosenquist D, Kirmiza C, Labavitch JM, Lebrilla CB. 2005. Determination of pathogen-related enzyme action by mass spectrometry analysis of pectin breakdown products of plant cell walls. *Anal. Biochem.* 338, 71–82.
- Barth MM, Zhou C, Mercier J, Payne FA. 1995. Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *J. Food Sci.* 60, 1286–1288.
- Benítez-Burraco A, Blanco-Portales R, Redondo-Nevado J, Bellido M, Moyano E, Caballero J, Muñoz-Blanco J. 2003. Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv Chandler) pectate lyase genes. *J. Exp. Bot.* 54, 633-645.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G, 1973. New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.* 54, 484-489.
- Brisson L, Tenhaken R, Lamb C. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6, 1703-1712.
- Brummell DA, Harpster MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47, 311-340.
- Brummell DA. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* 33, 103-119.
- Brummell DA, Hall BD, Bennett AB. 1999. Antisense suppression of tomato endo-1,4-β-glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Mol. Biol.* 40, 615–622.
- Brummell DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB, Dunsmuir P. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11, 2203–2216.
- Brummell DA, Labavitch JM. 1997. Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiol.* 115, 717–725.
- Bustamante CA, Rosli HG, Amon MC, Civello PM, Martinez GA. 2006. β-Xylosidase in strawberry fruit: Isolation of a full-length gene and analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Sci.* 171, 497–504.
- Cantu, D, Vicente AR, Dewey M, Bennett ABB, Labavitch JML, Powell ALT. 2008a The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 859-864.

- Cantu D, Vicente AR, Labavitch JM, Bennett AB Powell ALT. 2008b. Strangers in the matrix: plant cell wall and pathogen susceptibility. *Trends Plant Sci.* 13, 610-617.
- Carpita N, McCann M. 2000. The plant cell wall. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists.
- Carpita NC, Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30.
- Carrington CMS, Greve LC, Labavitch JM. 1993. Cell wall metabolism in ripening fruit (VI. Effect of the antisense polygalacturonase gene on cell wall changes accompanying ripening in transgenic tomatoes). *Plant Physiol.* 103, 429-434.
- Chaidez C, Lopez J, Vidales J, Campo NC. 2007. Efficacy of chlorinated and ozonated water in reducing *Salmonella typhimurium* attached to tomato surfaces. *Int. J. Environ. Health Res.* 17, 311-318.
- Chun JP, Huber DJ. 1998. Polygalacturonase-mediated solubilization and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. Regulation by pH and ionic conditions. *Plant Physiol.* 117, 1293–1299.
- Cleenput G, Hessing M, Van Oort M, Deconynck M, de Cour JA, 1997. Purification and characterization of a β -xylosidase and an endo-xylanase from wheat flour. *Plant Physiol.* 113, 377-386.
- d'Amour J, Gosselin C, Arul J, Castaigne F, Willemot C, 1993. Gamma-radiation affects cell wall composition of strawberries. *J. Food Sci.* 58, 182-185.
- Das E, Gürakan DC, Bayindirh A, 2006. Effect of controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and gaseous ozone treatment on the survival of *Salmonella enteritidis* on cherry tomatoes. *Food Microbiol.* 23, 430-438.
- Dickson RG, Law SE, Kays SJ, Eiteman MA. 1992. Abatement of ethylene by ozone treatment in controlled atmosphere storage of fruits and vegetables. *Proc. 1992 International Winter Meeting, Am. Soc. Agric. Eng.* 1-9.
- Fischer RL, Bennett AB. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 675–703.
- Fry SC. 1982. Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein *Biochem. J.* 204, 449-455.
- Gross KC, 1982. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyano-acetamide. *HortScience* 17, 933-934.
- Gross KC, Sams CE. 1984. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochem.* 23, 2457-2461.
- Gross KC, Starrett DA, Chen HJ. 1995. Rhamnogalacturonase, α -galactosidase, and β -galactosidase: potential roles in fruit softening. *Acta Horticulturae* 398, 121–129.

- Guzel-Seydim ZB, Greene AK, Seydim C. 2004. Use of ozone in the food industry. *Lebensm. Wiss. Technol.* 37, 453-460.
- Hadfield KA, Bennett AB. 1998. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiol.* 117, 337-343.
- Henrissat B, Coutinho PM, Davies GJ. 2001. A census of carbohydrate active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 47, 55-72.
- Huber DJ. 1984. Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *J. Food Sci.* 49, 1310-1315.
- Ignatenko AV, Cherenkevich SN. 1985. Covalent cross-linking and protein destruction induced by ozone. *Biofizika* 30, 18-22.
- Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevado J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol.* 128, 751-759.
- Khadre MA, Yousef AE. 2001. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: A comparative study. *International J. Food Microbiol.* 71, 131-138.
- Kim JG, Yousef AE, Dave S. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *J. Food Prot.* 62, 1071-1087.
- King GJ, Maliepaard C, Lynn JR, Alston FH, Durel CE, Evans KM, Griffon B, Laurens F, Manganaris AG, Schrevens E, Tartarini S, Verhaegh J. 2000. Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theor. Appl. Genet.* 100, 1074-1084.
- Langebartels C, Wohlgenuth H, Kschieschan S, Grün S, Sandermann H. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 567-575.
- Liew CL, Prange RK. 1994. Effect of ozone and storage temperature on post-harvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L.). *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119, 563-567.
- Maclachlan G, Brady C. 1994. Endo-1,4- β -glucanase, xyloglucanase and xyloglucan endo-transglycosylase activities versus potential substrates in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 105, 965-974.
- Marín-Rodríguez MC, Orchard J, Seymour GB. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* 53, 2115-2119.
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* 4, 1425-1433.
- Mitcham EJ, Gross KC, Ng TJ. 1989. Tomato fruit cell wall synthesis during development and senescence. *Plant Physiol.* 89, 477-481.
- Mutter M, Beldman G, Pitson SM, Schols HA, Voragen AGJ. 1998. Rhamnogalacturonan-galactopyranosyluronohydrolase. An enzyme that specifically removes the terminal nonreducing galacturonosyl residue in rhamnogalacturonan regions of pectin. *Plant Physiol.*

117, 153–163.

- O'Donoghue EM, Huber DJ. 1992. Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assessment of the role of Cxcellulase. *Physiol. Plant.* 86, 33-42.
- O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darvill AG. 2001. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. *Science* 294, 846–849.
- O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG. 2004. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 109–139.
- Palou L, Crisosto CH, Smilanick JL, Adaskaveg JE, Zoffoli JP. 2002. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 24, 39–48.
- Pascual A, Llorca I, Canut A. 2007. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends Food Sci. & Technol.* 18, S29-S35.
- Peña MJ, Carpita NC. 2004. Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. *Plant Physiol.* 135, 1305–1313.
- Perez AG, Sanz C, Rios JJ, Olias R, Olias JM 1999. Effects of ozone treatment on postharvest strawberries quality. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1652–1656.
- Phan TD, Bo W, West G, Lycett GW, Tucker GA. 2007. Silencing of the major salt-dependent isoform of pectinesterase in tomato alters fruit softening. *Plant Physiol.* 144, 1960–1967.
- Popper ZA, Fry SC. 2005. Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. *Ann Bot* 96, 91–99.
- Redgwell RJ, MacRae E, Hallett I, Fisher M, Perry J, Harker R. 1997. *In vivo* and *in vitro* swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta.* 203, 162-173.
- Ribeiro J, Pereira CS, Soares N, Vieira A, Feijó J, Jackson P. 2006. The contribution of extensin network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes. *J. Exp. Bot.* 57, 2025 - 2035.
- Rice RG, Farguhar JW, Bollyky LJ. 1982. Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods. *Ozone Sci. Eng.* 4, 147–163.
- Rico D, Martin-Diana B, Frias JM, Henehan GTM, Barry-Ryan C. 2006. Effect of ozone and calcium lactate treatments on browning and texture properties of fresh-cut lettuce. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2179-2188.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem* 57, 929–967.
- Rodoni L. 2008. Efecto de tratamientos con ozono sobre la calidad y vida poscosecha de tomate (*Solanum lycopersicum*) y frutilla (*Fragaria x annanassa*). Tesis de Licenciatura en Ciencias y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. 65 pp.

- Rogers LM, Kim YK, Guo W, González-Candelas L, Li D, Kolattukudy PE. 2000. Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 9813–9818.
- Rose JKC, Catala C, Gonzalez-Carranza ZH, Roberts J. 2003. Plant cell wall disassembly, in The Plant Cell Wall, ed. By Rose JKC. Blackwell. Oxford. 264–324.
- Rose JKC, Cosgrove DJ, Albersheim P, Darvill AG, Bennett AB. 2000. Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. Plant Physiol. 123, 1583–1592.
- Rose JKC, Lee HH, Bennett AB. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. Proc Natl Acad Sci USA 94, 5955-5960.
- Rose JKC, Hadfield KA, Labavitch JM, Bennett AB. 1998. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. Plant Physiol. 117, 345-361.
- Salentijn EMJ, Aharoni A, Schaart JG, Boone MJ, Krens FA. 2003. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. Physiol. Plant. 18, 571–578.
- Sanderman H, Dieter E, Heller W, Lagenbarter C. 1998 Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. Trends Plant Sci. 3, 47-50.
- Santiago-Doménech N, Jiménez-Bemúdez S, Matas A, Rose J, Muñoz-Blanco J, Mercado J, Quesada M, 2008. Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. J. Exp. Bot. 59, 2769-2779.
- Sarig P, Zahavi T, Zutkhi Y, Yannai S, Lisker N, Ben-Arie R. 1996. Ozone for control of postharvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 48, 403–415.
- Searle-van Leeuwen MJF, van den Broek LAM, Schols HA, Beldman G, Voragen AGJ. 1992. Rhamnogalacturonan acetyltransferase: a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 347–349.
- Sexton R, Palmer JM, Whyte N, Littlejohns S. 1997. Cellulase, fruit softening and abscission in red raspberry *Rubus idaeus* L. cv Glen Clova. Ann. Bot. 80, 371-376.
- Seymour GB, Colquhoun IJ, Dupont MS, Parsley KR, Selvendran RR. 1990. Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. Phytochem. 29, 725-731.
- Shackel KA, Greve C, Labavitch JM, Ahmadi H. 1991. Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. Plant Physiol. 97, 814–816.
- Shvchik VE, Beaudouy JR, Cotte-Pattat NH. 1997. Pectate lyase Pcl of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. J. Bacteriol. 179, 7321–7330.
- Smilanick JL. 2003 Postharvest use of ozone on citrus fruit. Packinghouse Newsletter 199, 1–6.
- Smith DL, Gross KC. 2000. A family of at least seven β -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. Plant Physiol 123, 1173–1183.

- Smith DL, Abbott JA, Gross KC. 2002. Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiol* 129, 1755–1762.
- Sozzi GO, Greve LC, Prody GA, Labavitch JM. 2002. Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate α -L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase tomato pericarp discs. *Plant Physiol.* 129, 1330–1340.
- Thompson JE, Fry SC. 2000. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension cultured rose cells. *Planta* 211, 275–286.
- Tieman DM, Handa AK. 1994. Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. *Plant Physiol.* 106, 429–436.
- Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G, Handa AK. 1992 An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell* 4, 667–679.
- Tzortzakis N, Borland A, Singleton I, Barnes J. 2007a. Impact of atmospheric ozone-enrichment on quality-related attributes of tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 317-325.
- Tzortzakis N, Singleton I, Barnes J. 2007b. Deployment of low-level ozone-enrichment for the preservation of chilled fresh produce. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 261–270.
- Tzortzakis N, Singleton I, Barnes J. 2008. Impact of low-level atmospheric ozone-enrichment on black spot and anthracnose rot of tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 1–9.
- United States Food and Drug Administration (US-FDA), 1997. Substances generally recognized as safe, proposed rule. *Federal Register* 62, 18937–18964.
- Vercauteren I, de Almeida Engler J, De Groodt R, Gheysen G. 2002. An *Arabidopsis thaliana* pectin acetyltransferase gene is upregulated in nematode feeding sites induced by root-knot and cyst nematodes. *Mol. Plant Micr. Int.* 4, 404–407.
- Verweij H, Christianse K, Van Steveninck J. 1982. Ozone-induced formation of O,O'-dityrosine cross-links in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 701, 180-184.
- Vicente AR. Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura sobre calidad y vida postcosecha de frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.). PhD Thesis. Universidad Nacional de La Plata: Argentina; 2004.
- Vicente AR, Costa L, Civello M, Martínez G, Chaves A. 2006. Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 38, 213-222.
- Vicente AR, Saladie M, Rose JKC, Labavitch JML. 2007a. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *J. Sci. Food Agric.* 87, 1435-1448.
- Vicente AR, Ortugno C, Powell ALT, Greve CL, Labavitch JM. 2007b. The temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits: 1. Analysis of raspberry (*Rubus idaeus*). *J. Agric. Food Chem.* 55, 4125-4130.

- Vicente AR, Powell AL, Greve C, Labavitch JM. 2007c. Cell wall disassembly events in boysenberry (*Rubus hybrid*) fruit development. *Funct. Plant Biol.* 34, 1–10.
- Vogel JP, Raab TK, Schiff C, Somerville SC. 2002. PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 2095–2106.
- Waldron KW, Parker ML, Smith AC. 2003. Plant cell walls and food quality. *Compr. Rev. Food Sci. Safety* 2, 101–119.
- Williams DW, Montecalvo J, Mueller E, Earls D, Swanson K, Petersen L. 1995. Ozonation as an alternative disinfectant for carrot wash water. *Annu. Meet. Inst. Food Technol.* 8.
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47, 9–27.
- Xu, 1999 L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables, *Food Technology* 53, 58–61.
- Yakoby N, Beno-Moualem D, Keen NT, Dinoor A, Pines O, Prusky D. 2001. *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit–fungus interaction. *Mol. Plant Micr. Int.* 14, 988–995.
- Yemm EW, Willis AJ. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57, 508-514.
- Zykwinska AW, Ralet MCJ, Garnier CD, Thibault JFJ. 2005 Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol* 139, 397–407.